

10012, 10013, 10034, 10042

Histopatologisk karakterisering av equint sarkom og molekylærbiologisk analyse for potensielt BPV-infeksjon som årsak

BI301305 Bacheloroppgave

Bacheloroppgave i bioingeniørfag

Veileder: Ann-Kristin Tveten

Medveileder: Anne Elin Varhaugvik

Mai 2024

10012, 10013, 10034, 10042

Histopatologisk karakterisering av equint sarkom og molekylærbiologisk analyse for potensielt BPV-infeksjon som årsak

BI301305 Bacheloroppgave

Bacheloroppgave i bioingeniørfag
Veileder: Ann-Kristin Tveten
Medveileder: Anne Elin Varhaugvik
Mai 2024

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden

Sammendrag

Sarkom er et økende problem blant fritidshester. Bovint papillomavirus type 1 (BPV-1), BPV-2 og mer nylig BPV-13 er assosiert med utvikling av sarkom hos hester. Siden BPV hverken er klassifisert gjennom virustyping eller ved histologisk undersøkelse, er det utfordrende å avgjøre den beste behandlingsmetoden. Denne oppgaven tar stilling til om histopatologiske karakteriseringer eller RT-LAMP kan være hensiktsmessige diagnostiske verktøy for å utrede BPV, og om de kan brukes som behandlingsindikatorer. De histologiske undersøkelsene gikk ut på snitting og farging av vevsmaterialer tatt fra ulike områder på sarkomet. Disse ble farget med rutinefargene HES og HE. De ble så vurdert under mikroskopet. Det ble observert flere endringer i vevet som samsvarer med endringer man ser ved andre virusinfeksjoner, slik som nekrotiske områder og infiltrasjon av immunceller. Det ble også observert dannelse av blodtilførselsganger som forsynte sarkomet med blod. Det histologiske bildet varierte, avhengig av hvor vevet var hentet fra på sarkomet. RT-LAMP ble brukt som påvisningsmetode for BPV-1, BPV-2 og/eller BPV-13 i sarkomet. Resultatet var entydig negativt for BPV-1 og -13, men inkonklusivt for BPV-2. Det trengs mer forskning og videre utvikling av RT-LAMP for å vurdere om dette kan benyttes som molekylærbiologisk påvisningsmetode for BPV-infeksjon.

Abstract

Sarcomas are an increasing issue among leisure horses. Bovine papillomavirus type 1 (BPV-1), BPV-2 and more recently BPV-13 have been associated with the development of equine sarcomas. BPV has not been classified by neither virus-typing nor by histological examination, which makes it challenging to determine a suitable and effective treatment. This thesis considers whether histopathological characterizations or RT-LAMP can be suitable diagnostic techniques to examine BPV, and whether they can be used as treatment indicators. The histological methods included sectioning and staining of the tissue taken from various areas of the sarcoma. The samples were then colored using HES and HE, followed by microscopic examination. Several changes were observed in the tissue that corresponded to the changes seen in other viral infections, such as necrotic areas and infiltration of immune cells. Formations of blood vessels, which supplied the sarcoma with blood, were observed as well. The histological picture varied, depending on which area of the sarcoma the tissue was harvested from. RT-LAMP was used as a detection method for BPV-1, BPV-2 and/or BPV-3 in the sarcoma. The result was unambiguously negative for BPV-1 and -13, but inconclusive for BPV-2. More research and further development of RT-LAMP is required to assess whether this can be used as a molecular biological detection method for BPV-infection.

Forord

Dette bachelorprosjektet ble gitt av Institutt for Biologiske fag, Ålesund (IBA) ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Oppgaven avslutter siste del av bioingeniørutdanningen ved Institutt for biologiske fag, Ålesund ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU).

I denne oppgaven fordyper vi oss i histopatologiske teknikker, og hvordan disse kan brukes til å karakterisere utviklingen av equint sarkom ved mistenkt BPV-infeksjon, samt påvisning av den mistenkte BPV-infeksjonen gjennom molekylære påvisningsmetoder. Det er begrenset med tilgjengelig litteratur på BPV-infeksjoner og histopatologiske endringer, samt bruken av molekylære påvisningsmetoder for BPV-infeksjon, noe som belyser behovet for å studere dette nærmere.

Problemstillingen, sammen med flinke og kunnskapsrike veiledere, vekket stor interesse hos oss, noe som var grunnen til hvorfor vi valgte denne bacheloroppgaven. Oppgaven består av et utvalg av histopatologiske bilder fra ulike deler av et sarkom tatt før og etter behandling, samt et komplett bildebibliotek med ytterligere beskrivelser.

Vi vil rette en stor takk til våre faglige og praktiske veiledere; Førsteamanuensis Ann-Kristin Tveten og universitetslektor og bioingeniør Anne Elin Varhaugvik, som har gitt svært god hjelp underveis i bachelorprosjektet. Vi ønsker å takke dere for at dere har delt av deres kunnskap og erfaring, og har fulgt oss tett gjennom oppgaven. Dere har vært engasjerte, imøtekommende og blide under hele perioden, og tatt imot alle spørsmål med et smil. Vi ønsker også å rekke en takk til veterinærene, som donerte overskuddsvev og gjorde denne oppgaven mulig.

Innholdsfortegnelse

SAMMENDRAG	1
ABSTRACT	2
FORORD	3
1 INNLEDNING	6
1.1 PROBLEMSTILLING	6
2 TEORI	7
2.1 KLASSIFISERING AV EQUINE SARKOM	7
2.1.1 <i>Okkult sarkom</i>	7
2.1.2 <i>Vortelignende-sarkomer</i>	7
2.1.3 <i>Nodulær sarkomer</i>	7
2.1.4 <i>Fibroblastisk sarkom</i>	8
2.1.5 <i>Blandet sarkom</i>	8
2.1.6 <i>Ondartet sarkom</i>	8
2.2 BEHANDLING	9
2.3 HISTOLOGISKE KJENNETEGN VED EQUINT SARKOM	9
2.4 ANALYSEMETODER FOR HISTOPATOLOGISK KARAKTERISERING AV SARKOM	10
2.4.1 <i>Aparafinisering og rehydrering</i>	10
2.4.2 <i>HES- og HE-farging</i>	10
2.5 BOVINT PAPILLOMAVIRUS	11
2.5.1 <i>Papillomavirus</i>	11
2.5.2 <i>Klassifisering av ulike typer bovint papillomavirus</i>	11
2.5.3 <i>Patogenese og BPV-infeksjon hos hester</i>	12
2.6 MOLEKYLÆRE PÅVISNINGSMETODER (RT-LAMP) FOR BPV-VIRUS SOM MULIG ÅRSAK TIL SARKOM 13	
3 MATERIALER OG METODER	15
3.1 PRØVEMATERIALE: UTDILT SARKOM FRA LOKAL HEST	15
3.2 KLARGJØRING AV VEVSBLØKKER	16
3.2.1 <i>Dekalsinering</i>	16
3.2.2 <i>Snitting og feste til objektglass</i>	16
3.2.3 <i>Aparafinisering og rehydrering</i>	17
3.2.4 <i>HES- og HE-farging</i>	17
3.2.4.1 <i>HES-farging</i>	17
3.2.4.2 <i>HE-farging</i>	18
3.2.5 <i>Dehydrering og opplegg i xylen</i>	18
3.2.6 <i>Montering og mikroskopering</i>	18
3.3 MAKROBESKJÆRING AV VEV OG DNA-EKSTRAKSJON	18
3.3 RT-LAMP	19
4 RESULTATER	21
4.1 DEKALSINERING OG SNITTING	21
4.1.1 <i>Biopsier før behandling (A-blokkene)</i>	21
4.1.2 <i>Biopsier under behandling (B-blokkene)</i>	22
4.1.3 <i>Biopsier under behandling (C-blokkene)</i>	24

4.1.4 Utfordrende vevsblokker	26
4.2 HISTOPATOLOGISK KARTLEGGING.....	27
4.2.1 A-blokkene	27
4.2.2 Biopsier under behandling (B-blokkene)	29
4.2.3 Biopsier under behandling (C-blokkene)	38
4.3 RT-LAMP.....	49
5 DISKUSJON	50
5.1 KARAKTERISERING AV EQUIT SARKOM.....	50
5.2 HISTOPATOLOGISK KARTLEGGING.....	50
5.2.1 A-snittene	51
5.2.2 B-snittene	52
5.2.3 C-snittene	56
5.3 HISTOPATOLOGISKE UTFORDRINGER	59
5.3 MOLEKYLÆRE PÅVISNINGSMETODER FOR BPV-VIRUS	61
5.3.1 RT-LAMP	61
6 KONKLUSJON	63
7 LITTERATURLISTE.....	64
8 VEDLEGG.....	66
VEDLEGG 1.....	67
VEDLEGG 2.....	69
VEDLEGG 3.....	74
VEDLEGG 4.....	91
VEDLEGG 5.....	92
VEDLEGG 6.....	106
VEDLEGG 7.....	107

1 Innledning

1.1 Problemstilling

Sarkom er et økende problem blant fritidshester, hvor utviklingen av sarkomet kan ha flere ulike årsaker. En av disse er infeksjon med bovint papillomavirus, oftest type 1 og 2, og nå nylig type 13 (1, 2). Det finnes flere ulike typer sarkom, hvor noen er mer aggressive enn andre. Sarkomene vokser blant annet i områder som påvirker hestens mobilitet, noe som igjen reduserer hestens livskvalitet, velvære og verdi (3). Det finnes få vitenskapelige studier som ser på histologiske forandringer ved sarkom-utvikling hos hest, og samtidig benytter molekylærbiologiske påvisningsmetoder for kartlegging av type BPV-infeksjon som har ført til sarkom-utviklingen. Siden BPV hverken er klassifisert gjennom virustyping eller ved histologisk undersøkelse, er det utfordrende å avgjøre den beste behandlingsmetoden. Denne oppgaven tar stilling til om histopatologiske karakteriseringer eller RT-LAMP kan være hensiktsmessige diagnostiske verktøy for å utrede BPV, og om det dermed kan brukes som behandlingsindikatorer for et utdelt sarkom hentet fra en lokal hest. Av hensyn til oppgavens natur er det naturlig at resultatene utdypes i resultat-seksjonen for at funnene skal gi mening. Funnene vil utdypes ytterligere i diskusjonen.

Ordliste

BPV - Bovint papillomavirus

LCR – Langkodet region

ORF – Open reading frame/åpen lesingsramme

«HiTe» - Highly concentrated Tris-mediated DNA extraction»

«Histiocytter» - En celle som enten kommer fra makrofag- eller Langerhans' cellelinje

«Palpabel» - en struktur eller utvekst som kan beføles

«Pappillae-formasjoner» - Vorteliknende struktur, og utvikles ofte på hud eller slimhinne

«Pedunkulær» - En tilknyttende struktur formet som en stilk

Sarkom – fellesbetegnelse på ondartede svulster som oppstår i støtte- og bindevev

«Whorling» - «Hvirvling», beskriver mønsteret i bindevev som kan oppstå ved infeksjoner

«N/C ratio»: Nuclear–cytoplasmic ratio

«Basisfestet»: Festepunkt mellom tumor og normalt vev

2 Teori

2.1 Klassifisering av equine sarkom

Equine sarkomer kan klassifiseres ut i fra deres makroskopiske utseende, og deles vanligvis inn i seks ulike grupper av sarkomer; okkult, vorteligende-sarkom, nodulær, fibroblastisk, blandet og ondartet (4). Hester kan utvikle flere ulike typer sarkomer, og milde former kan utvikle seg til mer alvorlige typer. Ettersom de ulike typene sarkomer har ulike egenskaper og prognose er klassifisering dermed relevant for behandling og for å kartlegge beste terapeutiske tilnæringsmåte (4).

2.1.1 Okkult sarkom

Ved utvikling av okkulte sarkomer kan disse opptre som et grovt, sirkulært og hårløst område, som kan inneholde knuter. Det affiserte hudområdet kan opptre som tynt og/eller hyperkeratotisk. Videre kan okkulte sarkomer langsomt progrediere mot vortelignende vekst (4).

2.1.2 Vortelignende-sarkomer

Vortelignende-sarkomer er karakterisert gjennom dens vorteligende utseende, hvor huden kan ha hårløse lesjoner og være hyperkeratotisk med knuter og/eller okkulte glorier (4).

2.1.3 Nodulær sarkomer

Nodulære sarkomer kan forekomme som veldefinerte, subkutane sfæriske masser med en variabel diameter fra noen mm og opp mot 7 cm. De nodulære sarkomene kan ha flere sammenflettede knuter, og kan videre klassifiseres inn i type A eller type B med videre undergrupper, avhengig av hvor mye av huden og vevet rundt som er affisert (4). Ved type A₁ har man tilstedeværelse av knuter som kan flyttes fra huden og det underliggende vevet, hvor de vanligvis har en fibrocellulær kapsel. Ved type A₂ finner man knuter som ikke kan flyttes uavhengig av det underliggende vevet, og denne typen utvikles vanligvis rundt øynene (4). Ved type B finner man vanligvis synlige og/eller palpable endringer i huden, hvor den overliggende huden kan bære preg av sår, være hyperkeratotisk, mangle hår, være tynnet ut, ha tilstøtende okkulte forandringer eller se normal ut (4). Type B kan videre deles inn i type

B₁, hvor knutene ikke er involvert i de dypere strukturene, og type B₂ hvor knutene er mer invasive og ikke har noen adskillelse fra dypere lag (4).

2.1.4 Fibroblastisk sarkom

Ved fibroblastisk sarkom gir dette ofte mer aggressive og kjøttfulle, ulcerøse sår, samt sarkomer som ofte er dekket av skorper av fibrocellulær type. Denne typen sarkomer opptrer ofte i områder som lysk, øyelokk, distale lemmer, øvre del av hoven eller på områder med sårddannelser (4). Fibroblastisk sarkom kan videre klassifiseres inn i type 1 og 2, avhengig av hvilken type utvekst man ser. Ved type 1 får man ofte en pedunkulær utvekst, som gjerne består av tilsynelatende normal hud med en kjøttfull krone (4). Type 1 kan videre deles inn i undergruppe a og b, hvor man ved undergruppe a har en utvekst uten palpabel svulst med en fortykning ved basen og ingen utvidelser som kan påvises gjennom histologi, mens man ved type b har en utvekst med tydelig rotfeste, samt palpable endringer (4). Ved type 2 er sarkomet mer fastsittende, i tillegg til at de ofte er brede med dårlig definerte grenser, og inneholder omfattende invasjon av det laterale og dypere vevet (4).

2.1.5 Blandet sarkom

Sarkomer kan bli klassifisert som et «blandet sarkom», når man finner flere ulike typer sarkomer samtidig (det kan for eksempel være verrucose, nodulær og fibroblastisk type), og hvor man ikke har én dominerende type sarkom. De ulike typene sarkom kan være tilstede i varierende grad innenfor samme lesjon. På grunn av kombinasjonen av de ulike typene sarkomer har denne typen sarkom en tendens til å være mer aggressiv, sammenliknet med andre typer (4).

2.1.6 Ondartet sarkom

Ondartet sarkom oppstår vanligvis hos hester som har en historie med gjentatte traumer eller forstyrrelser i et sarkom, slik som f.eks upassende eller uegnet behandling av sarkomet. Denne typen sarkom opptrer vanligvis som lokalt invasive nodulære og fibroblastiske sarkomer på kjeve, ansikt, albue og mediallår. De kommer ofte i knuter eller ulcerøse lesjoner, og kan bli synlige eller følbare når de vokser subkutant. De omtales som maligne sarkomer, ettersom de har egenskapen til å spre seg via lymfekarene og føre til lymfeknuteforstørrelse (4).

2.2 Behandling

Det er utfordrende å finne en klar tilnærming for behandling av equine sarkom, da det finnes få studier av god kvalitet på emnet, samt at ulike typer sarkomer vil kreve ulike behandlingsstrategier (3). Noen behandlingsformer som har vist seg å være noe effektiv mot ulike typer sarkomer inkluderer stråleterapi, kjemoterapi eller elektrokjemoterapi, laserkirurgi og kryoterapi i kombinasjon med kirurgi og fjerning av sarkomet (3). Studier har vist at det er viktig med tidlig og effektiv behandling for å lykkes, og at mislykket behandling kan føre til en mer aggressiv tumor (3).

Ved kirurgisk fjerning av sarkomer kan opptil 70% av svulstene komme tilbake innen seks måneder, og da ofte i en mer aggressiv form som følge av aktivering av latente viruspartikler, eller at man ikke har fått fjernet hele tumoren. For å redusere risikoen for residiverende foretrekkes vanligvis elektrokirurgi eller laserkirurgi fremfor konvensjonell kirurgi (3). En annen alternativ behandlingstilnærming er å benytte intralesjonal kjemoterapi med platinoler, da denne behandlingsformen fjerner opp mot 94% av svulsten uten tilbakevendende residiv etter en oppfølgingsperiode på tre år. Dersom nevnte behandlingsmetode også brukes i kombinasjon med kirurgi kunne responsraten økes til 98% (3). Dersom man benytter elektrokjemoterapi med platinoler som behandling ble det sett en respons i tumoren på 91%, hvor det ikke ble oppdaget residiv under oppfølgingsperioden på fire år. Dersom denne behandlingsmetoden ble kombinert med kirurgi ble responsraten observert til 100% (3). Ved kryoterapi blir tumorvevet fryst og nekrotisert ved å benytte flytende nitrogen eller CO₂, noe som i kombinasjon med kirurgi har resultert i en responsrate mellom 42-78%, og hvor det ikke ble oppdaget residiv i en oppfølgingsperiode på seks måneder (3). En annen alternativ behandlingsmetode er å benytte topikale steroidkremer på de affiserte hudområdene med sarkomer, men som ikke er anbefalt ved perilokulære lesjoner, ettersom det gir høy risiko for skade på okulære strukturer (3).

2.3 Histologiske kjennetegn ved equint sarkom

Sarkomer oppstår fra spredningen av komponentene dermale fibroblaster og epidermale keratinocytter, og betraktes som bifasiske svulster (4). Det har blitt observert en rekke ulike,

mikroskopiske kjennetegn ved sarkomer. Disse inkluderer hyperkeratose, som er en fortykkelse av den ytre delen av epidermis, hyperplasi og papillae-dannelser, samt hvirvling (whorling), som kan sees i 86% av tumorer (4). Felles for de fleste sarkomer er fibroblastisk dermal proliferasjon (whorling) og tilstedeværelse av BPV-DNA (4). Cellebildet ved equint sarkom kan minne om cellebildet under infeksjon av andre virus, slik som heste-herpesvirus type 1. Ved infeksjon ser man gjerne en infiltrasjon av histiocyter, lymfocytter og plasmaceller. Her er det også vanlig at den glatte muskelen i tunica muscularis i segmentregioner blir erstattet av et tett bånd eosinofilt fibrin og nekrose (5).

2.4 Analysemetoder for histopatologisk karakterisering av sarkom

2.4.1 Avparafinisering og rehydrering

Før fargeprosedyren kan utføres må vevssnittet avparafiniseres og rehydreres. Dette gjøres fordi vevssnittet på objektglasset er omsluttet av parafin, og de fleste fargene som brukes er vannbaserte. For at fargene skal kunne trenge inn i vevet og avgi farge må derfor snittene avparafiniseres (6, 7). For å fjerne parafin benyttes xylen, men siden denne ikke er vannbasert må den fjernes før vevet plasseres i de vannbaserte fargeløsningene. For å gjøre dette blir vevet ført gjennom en rehydreringsprosess, som består av kar med synkende alkoholkonsentrasjoner; først absolutt alkohol, så 96% alkohol, så 70% alkohol, og til slutt destillert vann (6, 7). For å få et godt fargerresultat er det viktig at all parafinen fjernes, samt at vevet blir tilstrekkelig rehydrert og at det ikke står for kort eller lenge i de ulike alkoholbadene (6, 7)

2.4.2 HES- og HE-farging

HES er en trikrom-fargemetode, noe som vil si at den består av tre forskjellige farger: hematoxylin, erytrosin og safran (6, 7). Hematoxylin er det minste fargemolekylet og vil farge kromatinstrukturen i cellekjernene kraftig blå, mens erytrosin er det nest største fargemolekylet, og vil farge cytoplasma, muskler og erytrocytter rødt. Ved HE-farging benyttes kun hematoxylin og erytrosin, og benyttes vanligvis som standard fargemetode mange steder. Ved sykehuset i Ålesund benyttes også et tredje fargestoff, kalt safran (6, 7). Safran inneholder det gule fargestoffet crocein, som vil farge løst bindevev gult og gi en tydelig kontrast til de to andre fargemolekylene (6, 7).

Ettersom HES er en trikrom-fargemetode og består av tre fargemolekyler med ulike størrelser er det viktig at rekkefølgen til de ulike fargeløsningene opprettholdes (6, 7). Dersom rekkefølgen på fargeløsningene endres kan det føre til at de mindre fargemolekylene utkonkurreres av de større, eller at noen fargemolekyler blir ekstrahert (6, 7). Erytrosin er en svak syre med $\text{pH} > 2.5$, mens hematoxylin ekstraheres av syrer. Dersom erytrosin tilsettes før hematoxylin kan denne ekstraheres (6, 7). Safran er det største fargemolekylet, og må derfor tilsettes sist for å hindre at det utkonkurrerer de mindre fargemolekylene (6, 7).

2.5 Bovint papillomavirus

2.5.1 Papillomavirus

Papillomavirus tilhører *Papillomaviridae*-familien, og genomet er i gjennomsnitt 8000 basepar (1). Genomet til *Papillomavirus* består av fem til seks tidlige åpne lesingsrammer (ORFs), samt to sene åpne lesingsrammer. Ofte benyttes lesingsrammen ved L1 for å klassifisere ulike genus av *Papillomavirus*, ettersom dette er en av de best bevarte åpne lesingsrammene (1, 8). Dersom det er mindre enn 90% samsvar mellom ett *Papillomavirus*' L1 ORF og et annet blir det ansett som et annet genus (1). Virus innenfor samme genus vil typisk vise likheter når det gjelder vert, lokalisasjon og egenskaper. *Papillomavirus* blir videre delt inn i genera med virus-medlemmer som har mer enn 60% samsvar i deres L1 ORF-enheter (1). For tiden har over 280 *Papillomavirus* blitt delt inn i over 35 genera, hvor bovint papillomavirus (BPV) er ett av disse (1).

2.5.2 Klassifisering av ulike typer bovint papillomavirus

Bovint papillomavirus (BPV) er et lite, sirkulært dobbeltrådet DNA genom-virus, og tilhører *Papillomaviridae*-familien (8). BPV blir fylogenetisk klassifisert ut ifra dets homogenitet i DNA-sekvensen ved L1 (ORF) (1, 8). Dette har resultert i 15 ulike typer BPV. De 15 ulike typene med BPV har videre blitt delt inn i fire kategorier, kalt *Deltapapillomavirus* (BPV-1, -2, -13 og -14), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 og -9), *Xipapillomavirus* (BPV-3, -4, -6, -9, -10, -11, -12 og -15) og *Dyoxipapillomavirus* (BPV-7) (8). Blant disse er det BPV-1 og -2 som er assosiert med papillom og fibropapillom, samt urinblærecancer (8, 9). Vanligvis er *Papillomavirus* artsspesifikke og smitter for det meste ikke mellom arter, men BPV har vist seg å kunne smitte på tvers av arter, og har blitt påvist hos blant annet bovint storfe, bøffel og hester (1).

2.5.3 Patogenese og BPV-infeksjon hos hester

Genomet til BPV deles inn i tre regioner, kalt “Early” (E), “Late” (L) og lang-kodet-region (LCR). E-regionen koder for proteinene E1-E7 som alle har ulike funksjoner, og som er helt nødvendige for virus-replikasjonen (8). E-regionen inkluderer også onkoproteinene E5-E7, som kan føre til transformasjon av normale fibroblaster og keratinocytter til sarkom-celler (1, 3). Det har blitt observert en sammenheng mellom infeksjon med BPV og utvikling av mesenkymal neoplasi, noe som har blitt best studert i hester (1, 2). Disse studiene peker på at det er BPV innenfor *Deltapapillomavirus* som bidrar til utviklingen av sarkomer, hvor hester med sarkomer nesten alltid er infisert med BPV-1, BPV-2 og nylig BPV-13. Virus fra *Deltapapillomavirus* har også vist å kunne infisere både epitel og mesenkymceller, noe som resulterer i benigne og maligne lesjoner i hud og slimhinner (9). BPV-1 har blitt vist å transformere equine fibroblaster *in vitro*, noe som resulterer i celler som proliferer mye raskere, kan vokse uavhengig av feste/anchorage til vevet, og som har utvidet levetid (2, 10-12).

BPV-infeksjon oppstod først i kyr, og den naturlige historien for BPV-infeksjoner hos hest er usikker (11). Tidligere ble det antatt at hester ble smittet gjennom eksponering av smittede kyr, hvor hestene har vært en «dead-end»-vert og det ikke har skjedd en videre viral replikasjon eller smitte til andre arter og mennesker (2, 11). Nyere forskning foreslår at produktiv BPV-replikasjon kan skje i overliggende epidemis, noe som kan antyde at det ikke er nødvendig for hester å ha direkte kontakt med infiserte kyr for utvikling av sarkom (11). Nylig har BPV blitt påvist i blodet til hester, både med og uten sarkom, noe som kan antyde muligheten for blodbåren horisontal overføring (11). Dette kan forklare hvorfor det å være i kontakt med en hest med sarkom ser ut til å være en disponerende faktor for utvikling av sarkom (11).

Selv om BPV er involvert i utviklingen av sarkomer er patogenesen foreløpig ikke kartlagt. Ved inokulasjon av BPV til huden til hester vil enkelte hester utvikle pseudosarkomer, som i motsetning til naturlig forekommende sarkomer forblir små og spontant går tilbake. Enkelte hester forblir asymptomatiske til tross for BPV-infeksjon, mens andre hesteraser har vist å være mer genetisk utsatt for utvikling av sarkomer (11). Dette kan tyde på at det kreves

ytterligere kofaktorer, i tillegg til BPV-infeksjon, for utvikling av sarkom. Det har blant annet blitt vist at kofaktorer i beitebregner er en miljømessig faktor som kan bidra til utvikling av kreft ved samtidig tilstedeværelse av en BPV-infeksjon (9). Det har blitt utviklet BPV-1-vaksiner, noe som kan bidra til å kartlegge en mer presis rolle for BPV og utviklingen av sarkomer (11).

2.6 Molekylære påvisningsmetoder (RT-LAMP) for BPV-virus som mulig årsak til sarkom

Revers transkripsjon loop-mediert isotermal amplifikasjon, også forkortet RT-LAMP, er en analysemetode som amplifiserer nukleinsyrer, og gir en rask, sensitiv og spesifikk amplifisering av DNA under isotermale forhold (13). Analysemetoden benyttes for å detektere viralt RNA, og kan blant annet benyttes til å påvise infeksjonssykdommer som skyldes DNA- eller RNA-virus, slik som West Nil-virus, H5N1-influensa med flere (14). RT-LAMP er et raskere alternativ til de tradisjonelle PCR-analysene, og har lenge vært et rimeligere alternativ. RT-LAMP har tidligere blitt brukt i miljøer med færre ressurser hvor kvantitativ PCR-testing ikke har vært tilgjengelig eller vært for kostbart, men de senere årene har det blitt økt fokus på RT-LAMP som alternativ analysemetode for qPCR, noe som har resultert i forbedrede metoder og instrumenter knyttet til RT-LAMP (15). Dette har også åpnet mulighetene for å benytte RT-LAMP som metode fremfor PCR.

Analyseprinsippet i RT-LAMP baserer seg på mekanismen bak DNA-syntese, hvor man har en polymerase med høy aktivitet, samt fire til seks primere som binder seg til seks regioner av DNA-sekvensen som man ønsker å amplifisere. Dette gir metoden høy spesifisitet, og gir et høyt utbytte av DNA-sekvensen som man ønsker å replikere (13, 14). Amplifiseringen skjer vanligvis ved en konstant temperatur, ofte 65 grader celsius, noe som gjør at man ikke har behov for svært spesialiserte eller avanserte instrumenter, noe som gjør analysen rimeligere sammenlignet med RT-qPCR (13, 14). Ved å benytte fargeprober i reaksjonsmikserne som benyttes til påvisning vil man samtidig få en sterk fargereaksjon når polymerasen fester seg til målsekvensen av ønsket DNA, noe som gjør det mulig å detektere mengden DNA som amplifiseres gjennom de ulike syklusene uten å måtte bruke kostbare instrumenter (16). Det at reaksjonen skjer ved en konstant temperatur gjør også metoden langt raskere sammenlignet med tradisjonell PCR, hvor amplifisering og deteksjon av DNA ofte kan ta opp mot tre til fire

timer (16). RT-LAMP kan brukes på flere ulike prøvematerialer, inkludert swabs og vevsmaterialer, noe som gjør metoden svært anvendelig (13, 14) (**Qiagen, Germany**).

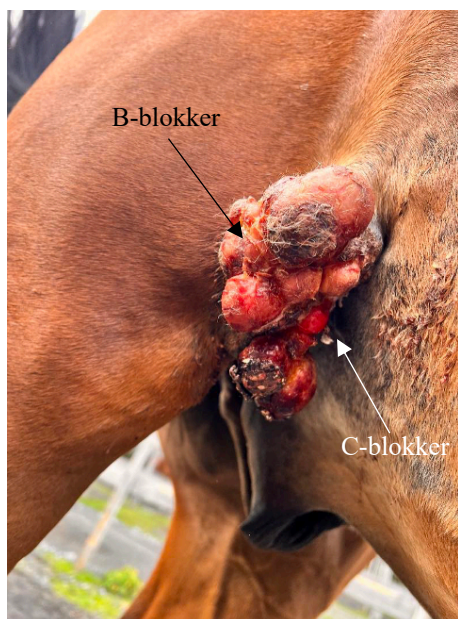
3 Materialer og metoder

3.1 Prøvemateriale: Utdelt sarkom fra lokal hest

Det ble utdelt et sarkom fra en lokal hest, hvor hesten hadde gjennomgått behandling med en steroidekrem blandet med en form for cellegift, som ble utført i forbindelse med rutinemessig behandling der deler av sarkomet ble fjernet. Vevet tilhørende A-blokkene ble hentet fra et eget vevsområde med noe sarkomutvikling i oktober -23. Vev som ble brukt til å støpe B- og C-blokkene ble derimot hentet ut fra et eget sarkom («primærsarkomet») i februar-23, hvor B-blokkene ble hentet fra utsiden av sarkomet som var i direkte kontakt med steroidekremen. C-blokkene ble hentet fra samme sarkom, men tilhørte en indre del av sarkomet som ikke var i direkte kontakt med steroidekremen (**bilde 1**). Alle blokkene ble utdelt ferdig makrobeskjært og parafinimpregnert.

Formålet med det utdelte sarkomet var å kartlegge om BPV er årsaken til sarkom-utviklingen gjennom å benytte molekylærbiologiske påvisningsmetoder, slik som RT-LAMP.

Histopatologisk undersøkelser og karakterisering av sarkom, slik som HES- og HE-farging ble benyttet for å studere histologiske forandringer som opptrer ved utvikling av sarkom og mulig BPV-infeksjon.



Bilde 1. Bildet viser sarkomet hvor de ulike vevsbløkkene ble hentet fra. Sarkomet som er avbildet ble brukt til å danne B- og C-blokkene, hvor B-blokkene er hentet fra ytre del av sarkomet, og C-blokkene er hentet fra en indre del av sarkomet.

3.2 Klargjøring av vevsblokker

Det ble utdelt 23 vevsblokker som var ferdig innstøpte med hestesarkomet, og som skulle snittes. Vevsblokkene ble først forsøkt trimmet for å teste ut hardhetsgraden, og om det var mulig å snitte disse uten dekalsinering. Vevsblokkene som var for harde til å snitte ble først dekalsinert i fem minutter, før de igjen ble forsøkt snittet og vurdert. De som fortsatt var for harde til snitting ble dekalsinert i ytterligere 2.5-5 minutter, avhengig av hvor harde de var på mikrotomet. I **tabell 10-12 i “4. Resultater”** vises en oversikt over hvor lenge hver vevsblokk ble dekalsinert før snitting.

3.2.1 Dekalsinering

Vevsblokkene som var for harde til snitting ble dekalsinert i et avtrekksskap ved å putte vevsblokken i et glasslokk med Perney’s dekalsinering, slik at løsningen dekket hele overflaten til vevsblokken. Etter at de hadde ligget ønsket tid i løsningen ble vevsblokken tørket over med et papir, og så lagt på en kjøleblokk før snitting. Se **tabell 1** for hvilke kjemikalier og mengder som har blitt brukt for å lage Perney’s dekalsinering.

Tabell 1. Tabellen viser en oversikt over innholdet i Perney’s dekalsinering. Løsningen var ferdigblandet, og det ble dryppet et par mL over i et glasslokk, slik at oversiden til vevsblokken var dekket med løsningen.

Kjemikalie	Mengde
10% HNO ₃	40 mL
Absolutt etanol	30 mL
0.5% kromsyre	30 mL

3.2.2 Snitting og feste til objektglass

Vevsblokkene ble forsøkt snittet på 2 µm på mikrotom for optimal farging med HES og HE. Det var tre blokker som var spesielt harde, selv etter dekalsinering, og som måtte snittes på 3 my for å få snitt som kunne brukes til det videre arbeidet. Se **tabell 10-12** under “**4 Resultater**” for en oversikt over blokkene og tykkelsen på de ulike snittene. Etter snitting ble vevet overført til et varmebad, og så plukket opp med et objektglass (*VWR® Microscope Slides*). Objektglassene ble så ført over i et stativ og puttet i et varmeskap (*VWR® INCU-Line*) som stod på 62 grader celsius, hvor de ble oppbevart i minimum 20 minutter for at snittet skulle få feste seg til objektglassene.

3.2.3 Avparafinisering og rehydrering

Et egnet snitt fra hver vevsblokk ble avparafinisert og rehydrert før farging. Snittene ble avparafinisert i to påfølgende xylene-bad, før de ble ført gjennom etanol-bad med synkende konsentrasjonsgrad fra absolutt etanol til 70% etanol, og til slutt rehydrert i destillert vann. Se **tabell 2** for en oversikt over hvor lenge snittene var i de ulike løsningene, samt konsentrasjonene på de ulike alkohol-badene.

Tabell 2. Tabellen viser en oversikt over de ulike løsningene som ble benyttet til å avparafinisere og rehydrere snittene, samt hvor lenge de var i de ulike løsningene. Tabellen viser kronologisk rekkefølge (øverst til nederst) for når de ble benyttet.

Kjemikalie	Tid
Xylen	2 minutter
Xylen	2 minutter
Absolutt etanol	1 minutt
96% etanol	1 minutt
70% etanol	1 minutt
Destillert vann	1 minutt

3.2.4 HES- og HE-farging

3.2.4.1 HES-farging

For å HES-farge snittene ble det benyttet Harris' hematoxylin, erytrosin og safran, samt etanol-bad med stigende konsentrasjon. I **tabell 3** vises en oversikt over hvor lenge snittene var i de ulike løsningene, samt hvilken rekkefølge som ble benyttet. Løsningene er oppgitt i kronologisk rekkefølge. Etter Harris' hematoxylin ble snittene blånet i romtemperert springvann.

Tabell 3. Tabellen viser hvilke løsninger som ble brukt, samt hvor lenge snittene ble oppholdt i de ulike løsningene, for HES-farging. Snittene var ferdig rehydrerte før farging, og ble igjen dehydrert etter farging for opplegg i xylen. Løsningene er oppgitt i kronologisk rekkefølge.

Kjemikalie	Tid
Destillert vann	Til stasjon for farging er ledig
Harris' hematoxylin	4 minutt
Vann (blåning)	5 minutter
Erytrosin	1 minutt
Destillert vann	15 sekunder
Destillert vann	15 sekunder
70% etanol	30 sekunder
96% etanol	30 sekunder
Abs. etanol	30 sekunder

Safran	1 minutt
Abs. etanol	30 sekunder
Abs. etanol	30 sekunder
Xylen	Til snittet skal monteres.

3.2.4.2 HE-farging

HE-farging benytter kun fargestoffene Harris' Hematoxylin og erytrosin. Det ble dermed brukt samme metode som HES-farging, med unntak av at snittene ikke ble dyppet i safran, men ført direkte til 70% etanol etter å ha blitt skylt i destillert vann.

3.2.5 Dehydrering og opplegg i xylen

Etter farging ble snittene dehydrert ved å føre de gjennom ulike etanol-bad med stigende konsentrasjon fra 70% og opp til absolutt etanol. Til slutt ble de ført over til xylen. Se **tabell 4** for en oversikt over hvor lenge snittene lå i de ulike etanol-badene.

Tabell 4. Tabellen viser løsningene som ble brukt, samt hvor lenge snittene lå i de ulike løsningene, for å bli dehydrert og lagt opp i xylen. Løsningene som ble brukt står i kronologisk rekkefølge.

Kjemikalie	Tid
70% etanol	30 sekunder
96% etanol	30 sekunder
Abs. Etanol	30 sekunder
Abs. Etanol	30 sekunder
Xylen	30 sekunder

3.2.6 Montering og mikroskopering

De ferdigfargede snittene stod i xylen frem til de skulle ha på dekkglass. Vevsnippet ble tilført lim, og dekkglass ble så raskt lagt over snittet. Luftbobler ble fjernet manuelt ved å bruke en q-tips dyppet i xylen, og rulle den over luftboblene. Snippet ble så satt til side for avdamping og tørking. Da den gjenkjennelige xylen-lukten ikke lenger kunne merkes ble snippet mikroskopert.

3.3 Makrobeskjæring av vev og DNA-ekstraksjon

For å kunne gjennomføre molekylærbiologiske metoder måtte vevet makrobeskjæres, og DNA ekstraheres. Formalinfikserte vevsbiter fra A- og B/C-bitene ble makrobeskjært med

skalpell no 21, hvor det ble byttet kniv mellom blokkene fra A og B/C. Vevet ble så rensset i PBS-buffer før det ble veid opp ønsket mengde i et veieskip. Se **tabell 5** for vekten på de ulike vevsbitene.

Tabell 5. Tabellen viser en oversikt over hvilke vevsblokker som ble makrobeskjært, samt i hvilke mengder, og videre brukt til DNA-ekstraksjon. Det ble byttet kniv mellom skjæring i A-bitene og B/C-bitene.

Vevsblokk	Mengde vev
A2-1	20.4 mg
A2-2	20.2 mg
A5-1	21 mg
A5-2	20 mg
A5-3	21 mg
B/C-1	20.4 mg
B/C-2	20.2 mg
B/C-3	19.8 mg
B/C-4	19.9 mg
B/C-5	21 mg

Vevsbitene ble deretter overført til individuelle 1.5 mL eppendorf-rør/sentrifugerør, og most til minst mulig biter. Til hvert sentrifugerør ble det tilsatt 180 µL ATL-buffer (*Qiagen, Germany*), samt 20 µL proteinase (*Qiagen, Germany*). Eppendorf-rørene med vevsbitene og reagensene ble lysert ved å plassere de i varmeskap (*VWR® INCU-Line*) ved 56 grader celcius i 18 timer. DNA ble til slutt ekstrahert fra lysert vev i henhold til prosedyren for formalinfikserte vev «DNeasy Blood & Tissue Handbook» (*Qiagen, Germany*).

3.3 RT-LAMP

For å gjennomføre RT-LAMP måtte vevet makrobeskjæres og prepareres, som beskrevet i prosedyren «DNeasy Blood & Tissue Kit» (*Qiagen, Germany*). Dette for å ekstrahere og rense DNA fra det formalinfikserte vevet, samt forebygge forurensninger som kan slå ut på analysen og påvirke resultatene. Vevet ble tilsatt ulike bufferløsninger for at det skulle bli lysert og DNA ble frigjort. Det ble videre brukt rør med membraner spesifikke for DNA, som ble rensset og tilsatt enzym-inhibitorer, og til slutt brukt i RT-LAMP (*Qiagen, Germany*). Deretter ble det laget en reaksjonsmiks spesifikk for BPV-1, -2 og -13 med tilhørende primer, lik at hvert virus fikk en egen spesifikk reaksjonsmiks (**tabell 6**).

Tabell 6. Tabellen viser innholdet i reaksjonsmiksen som ble brukt til påvisning av BPV-1, -2 og -13 gjennom RT-LAMP. Det ble regnet ut oppskrift til 12 prøver, og laget en egen reaksjonsmikse til påvisning for hvert av de tre virustypene med tilhørende primer.

Løsning	Mengde (mengde brukt til 12 prøver)
SuperScript™ IV RT-LAMP Mastermix	10 µL (120 µL)
FIP primer (10 µM)	3.2 µL (38.4 µL)
BIP primer (10 µM)	3.2 µL (38.4 µL)
F ₃ primer (10 µM)	0.4 µL (4.8 µL)
B ₃ primer (10 µM)	0.4 µL (4.8 µL)
LoopF primer (10 µM)	0.8 µL (9.6 µL)
LoopB primer (10 µM)	0.8 µL (9.6 µL)
Fersk SYTO™ 9 fargeløsning (50 µM)	2 µL (24 µL)
Nukleasefritt vann	1.6 µL (19.2 µL)

18 µL reaksjonsmiksen ble tilsatt i 200 µL brønner på PCR-brett, sammen med 2 µL nukleasefritt vann og 2 µL ekstrahert DNA. Det ble analysert to negative kontroller til hver BPV-variant. PCR-platen ble forseglet med plastfilm. Den ble sentrifugert ved 1200 RPM i to minutter. Analysen ble gjennomført ved AriaMx (Agilent Technologies), som vist i **tabell 7**.

Tabell 7. Tabellen viser en oversikt over analyseprogrammet som ble benyttet til RT-LAMP. Prøvene ble kjørt gjennom 60 sykluser, hvor de i trinn 2 ble inaktivert. Smeltekurven ble målt/detektert mellom 60-95 grader.

Trinn	Grader	Tid	Antall sykluser
1 Amplifisering	65	30 sekunder	60
2 Inaktivering	95	2 minutter	1
3 Smeltekurve	60-95	-	-

4 Resultater



4.1 Dekalsinering og snitting

De 23 utdelte vevsblokkene skulle snittes (oversikt vises i **tabell 8-11**). Alle snittene, foruten A₂-A₄, ble dekalsinert i minst fem minutter. Selv etter dekalsinering i fem minutter var det fortsatt noen snitt som var for harde, og disse ble dekalsinert ytterligere for å få gode nok snitt til det videre arbeidet. Vevsblokkene det gjelder, samt tid brukt på dekalsinering er vist i **tabell 9-11**. Grunnet hardheten i vevet var noen vevsblokker utfordrende å jobbe med, og disse ble arkivert (**tabell 11**).

4.1.1 Biopsier før behandling (A-blokkene)

Det ble utdelt tre blokker som kom fra biopsier tatt før oppstart av behandling, kalt A₂-A₄. Vevet i blokkene var tilstrekkelig mykt til snitting, og det var ikke nødvendig med dekalsinering. Den ene vevsblokken (A₄) var noe porøs og sprakk under snitting, og måtte omstøpes på nytt. I **tabell 8** vises en oversikt over blokkene, bilde av vevsblokkene, samt tykkelsen på snittene og antall snitt som ble brukt til videre arbeid.

Tabell 8. Tabellen viser en oversikt over vevsblokkene fra biopsien før behandling. I tabellen kan man se bilde av vevsblokken, samt tykkelsen på snittene og antall snitt som ble brukt i det videre arbeidet. Vevsblokkene som sprakk under skjæring og måtte støpes om er markert med «*».




Vevsblokk	Bilde av vevsblokk	Tykkelse på snitt og antall snitt
A ₂		2 µm Ett snitt til HES-farging Ett snitt til HE-farging
A ₃		2 µm Ett snitt til HES-farging


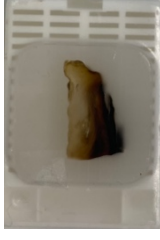




A4*		2 µm Ett snitt til HES-farging
-----	---	-----------------------------------

4.1.2 Biopsier under behandling (B-blokkene)

Vevsblokker fra B-blokkene var tatt like etter oppstart av behandling, og befant seg på utsiden av tumoren. Det ble utdelt ti vevsblokker, kalt B₁-B₁₀. Alle blokkene var for harde for snitting og måtte dekalsineres. I **tabell 9** vises en oversikt over blokkene med bilder av vevsblokkene, minutter brukt på dekalsinering, resultat etter dekalsinering, samt tykkelsen på snittene og antall snitt som ble brukt i det videre arbeidet. Det var noen blokker som var så skjøre at de måtte snittes på tre µm, fremfor to µm (**tabell 9**). Noen blokker var harde og sprakk under snitting, og måtte støpes om. Disse er markert med «*» i tabellen, og gjaldt vevsblokkene B₆, B₇ og B₁₀.

Tabell 9. Tabellen viser de ulike vevsblokkene, bilder over vevsblokkene, hvor lenge de ble dekalsinert, resultatet etter dekalsinering og tykkelsen på snittene, samt antall snitt som ble brukt i det videre arbeidet. Noen vevsblokker ble tilstrekkelig dekalsinert etter fem minutter, mens noen fortsatt var svært harde og måtte dekalsineres ytterligere. Vevsblokkene som sprakk under skjæring og måtte støpes om er markert med «*».




Vevsblokk	Bilde av vevsblokk	Minutter brukt på dekalsinering	Resultat etter dekalsinering	Tykkelse på snitt og antall snitt
B ₁		Åtte minutter	Vevsblokken ble først dekalsinert i fem min, men pga hardheten i vevet måtte det dekalsineres i ytterligere tre min. Først da var vevet tilstrekkelig mykt til snitting	2 µm Ett snitt til HES-farging
B ₂		Fem minutter	Vevsblokken var tilstrekkelig mykt til snitting	2 µm Ett snitt til HES-farging
B ₃		13 minutter	Vevsblokken ble først dekalsinert i fem min, men pga hardheten i vevet måtte det dekalsineres i to nye omganger på henholdsvis tre og fem minutter. Etter dette var vevet tilstrekkelig mykt til snitting.	2 µm Ett snitt til HES-farging

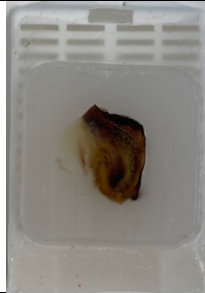


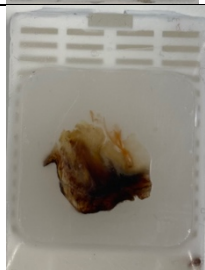


B ₄		Åtte minutter	Vevsblokken ble først dekalsinert i fem min, men pga hardheten måtte det dekalsineres i ytterligere tre min. Etter dette var vevet tilstrekkelig mykt til snitting.	2 µm Ett snitt til HES-farging
B ₅		Syv og et halvt minutt	Vevsblokken ble først dekalsinert i fem min, men pga hardheten måtte det dekalsineres i ytterligere to og et halvt minutt. Etter dette var vevet tilstrekkelig mykt til snitting.	2 µm Ett snitt til HES-farging
B ₆ *		Åtte min	Vevsblokken ble først dekalsinert i fem min, men pga hardheten måtte det dekalsineres i ytterligere tre min. Før den nye dekalsineringen sprakk også en bit av vevet, som falt av. Vevet var tilstrekkelig mykt til snitting etter den siste dekalsineringen.	3 µm Ett snitt til HES-farging
B ₇ *		Fem min	Vevsblokken var tilstrekkelig mykt til snitting. Under snitting knakk en del og sprakk opp i to biter, og vevet ble støpt om i ny blokk før snitting.	3 µm Ett snitt til HES-farging
B ₈		Fem min	Vevsblokken var tilstrekkelig mykt til snitting, men det var en del øverst av blokken som ikke kom med i snittet.	2 µm Ett snitt til HES-farging
B ₁₀ *		Åtte min	Vevsblokken ble først dekalsinert i fem minutter. Under snittingen knakk en del av, denne ble ikke jobbet med videre. Vevsblokken ble dekalsinert i ytterligere tre minutter, før vevet var tilstrekkelig mykt til snitting.	2 µm Ett snitt til HES-farging

4.1.3 Biopsier under behandling (C-blokkene)

Vevsblokker fra C-blokkene var tatt like etter oppstart av behandling, og befant seg på innsiden av tumoren. Det ble utdelt ti vevsblokker, kalt C₁-C₁₀. Alle blokkene var for harde for snitting og måtte dekalsineres. I **tabell 10** vises en oversikt over blokkene med bilder av vevsblokkene, minutter brukt på dekalsinering, resultat etter dekalsinering, samt tykkelsen på snittene og antall snitt som ble brukt til det videre arbeidet. Til tross for dekalsinering var det en blokk som var så skjør at den måtte snittes på tre my (**tabell 10**). En blokk var også så hard at den sprakk under snitting, og måtte støpes om. Denne er markert med «*» i tabellen, og gjaldt vevsblokken C₅.

Tabell 10. Tabellen viser de ulike vevsblokkene, bilder over vevsblokkene, hvor lenge de ble dekalsinert, resultatet etter dekalsinering og tykkelsen på snittene, samt antall snitt som ble brukt i det videre arbeidet. Noen vevsblokker ble tilstrekkelig dekalsinert etter fem minutter, mens noen fortsatt var svært harde og måtte dekalsineres ytterligere. Vevsblokkene som løsnet under skjæring og måtte støpes om er markert med «*».




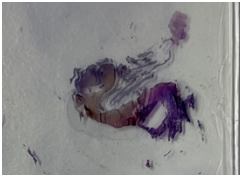
Snitt	Bilde av vevsblokk	Minutter brukt på dekalsinering	Resultat etter dekalsinering	Tykkelse på snitt og antall snitt
C ₁		Fem minutter	Vevet var tilstrekkelig mykt til snitting.	2 µm Ett snitt til HES-farging
C ₂		Fem minutter	Vevet var tilstrekkelig mykt til snitting.	2 µm Ett snitt til HES-farging
C ₃		Syv og et halvt minutt	Vevsblokken ble først dekalsinert i fem min, men grunnet hardheten i vevet måtte det dekalsineres i ytterligere to og et halvt minutt. Etter dette var vevet tilstrekkelig mykt til snitting.	2 µm Ett snitt til HES-farging

C4		Syv minutter	Vevsblokken ble først dekalsinert i fem min, men grunnet hardheten i vevet måtte det dekalsineres i ytterligere to minutter. Etter dette var vevet tilstrekkelig mykt til snitting.	2 µm Ett snitt til HES-farging
C5*		Fem minutter	Vevet var tilstrekkelig mykt til snitting, men sprakk i to biter under snitting og måtte støpes om.	2 µm Ett snitt til HES-farging
C6		Fem minutter	Vevet var tilstrekkelig mykt til snitting.	2 µm Ett snitt til HES-farging
C8		Åtte minutter	Vevsblokken ble først dekalsinert i fem min, men grunnet hardheten i vevet måtte det dekalsineres i ytterligere tre minutter. Etter dette var vevet tilstrekkelig mykt til snitting.	3 µm Ett snitt til HES-farging
C9		Fem minutter	Vevet var tilstrekkelig mykt til snitting, men det mangler litt av vevet øverst på blokken.	2 µm Ett snitt til HES-farging
C10		Åtte minutter	Vevsblokken ble først dekalsinert i fem min, men grunnet hardheten i vevet måtte det dekalsineres i ytterligere tre minutter. Etter dette var vevet tilstrekkelig mykt til snitting.	2 µm Ett snitt til HES-farging

4.1.4 Ufordrende vevsblokker

Av de 24 utdelte vevsblokkene var det to blokker som det ikke ble gjort viderearbeid med. Dette gjaldt vevsblokkene B₉ og C₇, hvor det ikke var mulig å få snitt, selv etter flere omganger med dekalsinering (**tabell 11**). Blokkene ble arkivert.

Tabell 11. Tabellen viser de to vevsblokkene som var for harde til snitting, og som måtte arkiveres. I tabellen vises også en oversikt over hvor lenge de ble forsøkt dekalsinert, samt resultatet etter forsøkt HES-farging.

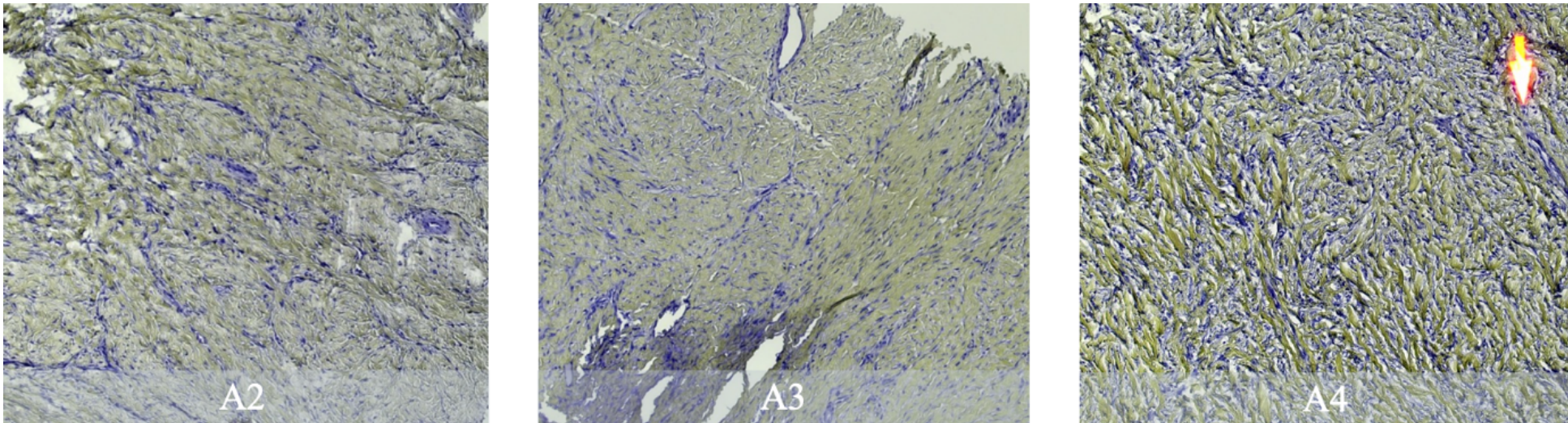
Vevsblokk	Bilde av vevsblokk	Minutter brukt på dekalsinering	Resultat etter dekalsinering	Tykkelse på snitt og antall snitt
B ₉		Ti minutter	Selv etter ti minutter dekalsinering var vevet fortsatt hardt og utfordrende å snitte. Snittene løsnet også under HES-farging. Blokken ble arkivert.	Ingen snitt. 
C ₇		Fem minutter	Vevet var tilstrekkelig mykt til snitting etter dekalsinering, men var porøst og smuldret opp. Under HES-farging løsnet vevet fra objektglasset. Blokken ble arkivert.	Ingen snitt 

4.2 Histopatologisk kartlegging

Alle snittene som ble beskrevet i metode-delen ble mikroskopert, hvor et utdrag bilder presenteres. Et komplett bildebibliotek finnes i **vedlegg 1-3**. Et utvalg av histopatologiske bilder er presentert her.

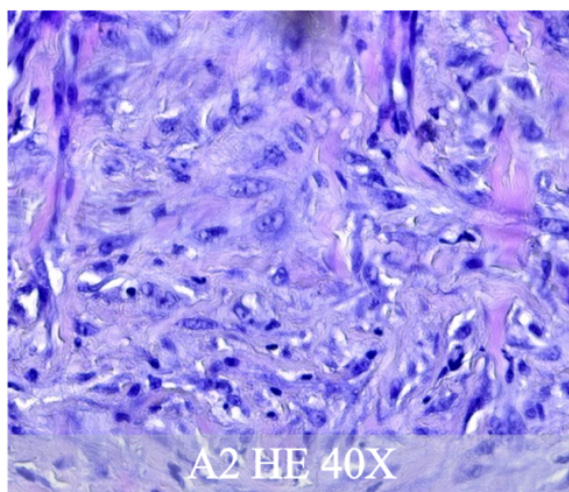
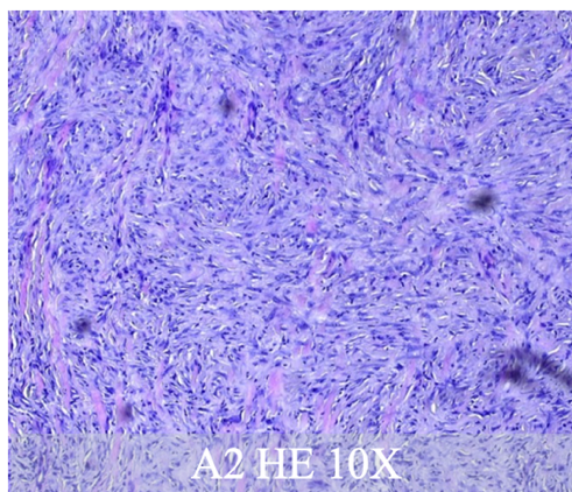
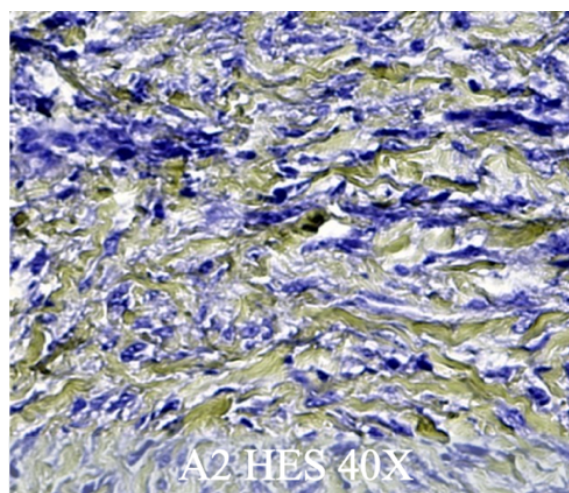
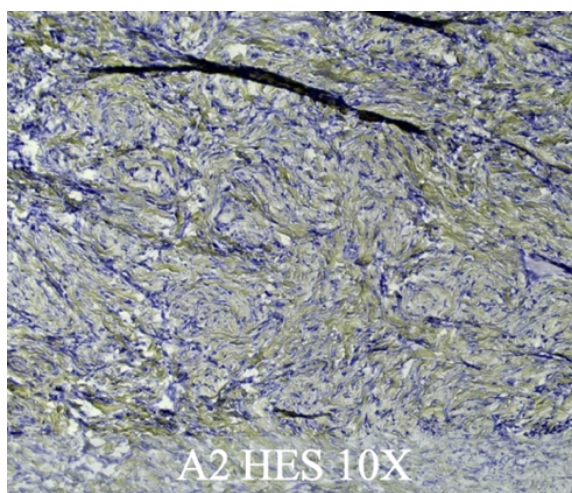
4.2.1 A-blokkene

A-blokkene viste generelt mye bindevev som hadde blitt farget gult av safran, samt en del spredte, forstørrede cellekjerne med lite cytoplasma. Dette ble observert i alle A-blokkene. I snittet fra A₂ ble det observert svært få celler, samt mye bindevev (**bilde 2**). Bindevevet så lineært ut, i tillegg til at det viste tendenser til å begynne å bli mer ustrukturert. De få cellene som ble observert lå spredt, i tillegg til at de hadde en forstørret cellekerne og mindre andel cytoplasma. Noen av cellene som ble observert var makrofager. Det ble også observert en ringformet struktur med et tykt lag celler rundt, noe som kunne minne om en blodåre. I snittet fra vevsblokk A₃ var det mulig å observere et tydelig skille mellom bindevev som opptrådte i bølger, og det som typisk er assosiert med normalt bindevev, og bindevev som var mer lineært og ustrukturert (**bilde 2**). Her ble det også observert strukturer som kunne minne om en arterie og en vene. I snittet fra A₄ var det mulig å se mye av det samme som i de to andre snittene, men her viste bindevevet enda mindre grad av struktur sammenliknet med de to andre snittene (**bilde 2**). Cellebildet var dominert av celler med forstørret cellekerne og liten andel cytoplasma, samt områder med sirkulære, åpne hulrom. En makrofag ble også observert.



Bilde 2. Bildet viser et snitt fra henholdsvis A₂ (helt til venstre), A₃ (midten) og A₄ (helt til høyre). I bildet fra A₄ er det mulig å se en makrofag (pil). Alle bildene ble tatt med 10X-objektiv.

Ved HES-farging ble det tydelig observert mye bindevev, samt noen spredte celler med forstørret kjerne og mindre andel cytoplasma rundt i bindevevet. Dette kom tydelig frem ved mikroskopering med 40X-objektiv (**bilde 3**). I snittet med HE-farging kom cellene tydeligere frem i snittet, hvor det var mulig å observere en stor andel nakne, forstørrede cellekjerne, i tillegg til celler som hadde forstørret cellekjerne og mindre andel cytoplasma, samt noen mindre, nakne cellekjerne (**bilde 3**).



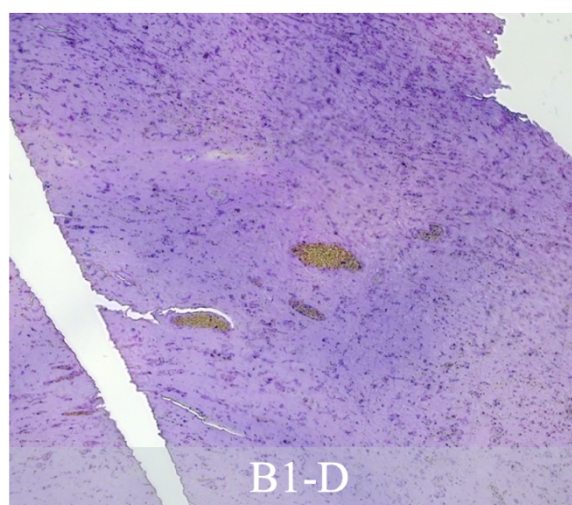
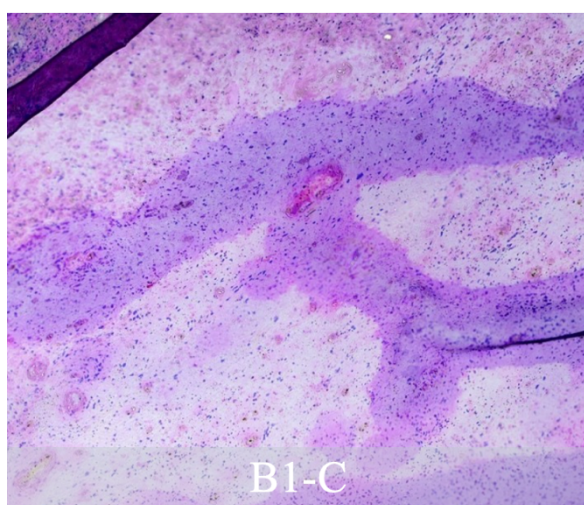
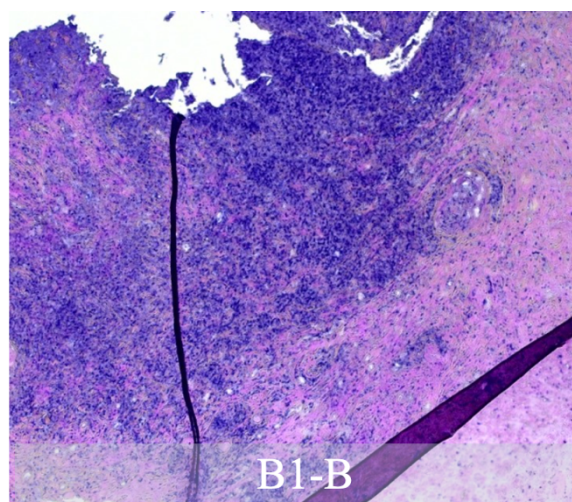
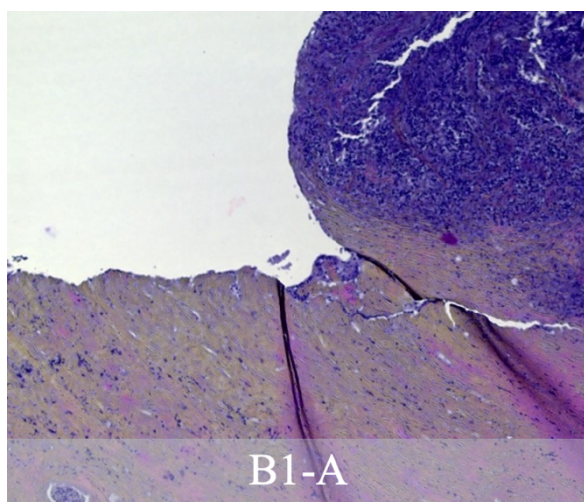
Bilde 3. Bildet viser snitt fra samme vevsblokk (A₂) farget med HES (øverst) og HE (nederst). I snittet farget med HES vises tydelig mengden bindevev, mens i snittet farget med HE kommer cellene tydeligere frem. De to bildene til venstre ble tatt med 10X-objektiv, mens de to bildene til høyre ble tatt med 40X-objektiv.

4.2.2 Biopsier under behandling (B-blokkene)

4.2.2.1 B₁

Cellebildet i snittet fra vevsblokk B₁ var dominert av store celleansamlinger med nakne, forstørrede og mørke cellekjerne (**bilde 4, A-B**). Det ble observert få celler i vevet utenom disse ansamlingene. Foruten celleansamlingene var det store rosa, cellefattige nekrotiske områder, samt gule «drag» av bindevev i de nekrotiske områdene (**bilde 4, C-D**). Ved mikroskopering ble det observert en stor, mørkelilla utvekst som la seg oppå vevet, og som inneholdt en stor ansamling av nakne, forstørrede cellekjerne (**bilde 4, A**). Det var mulig å finne flere områder i vevet med tydelige kontraster mellom det cellerike området med store ansamlinger av forstørrede, nakne cellekjerne, samt de mer cellefattige, nekrotiske områdene

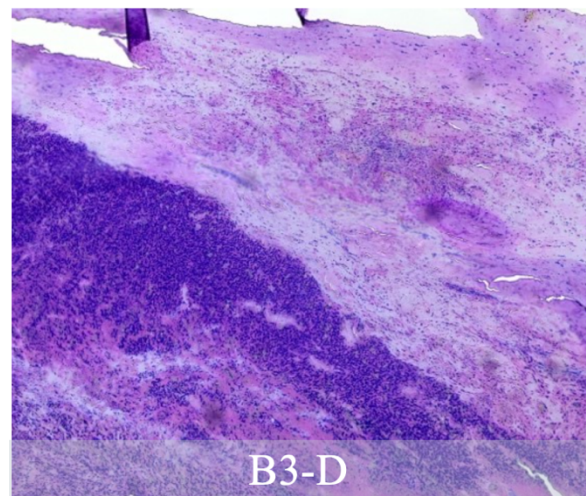
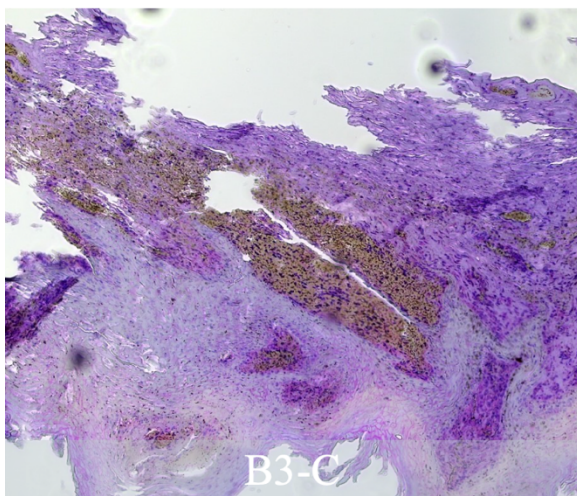
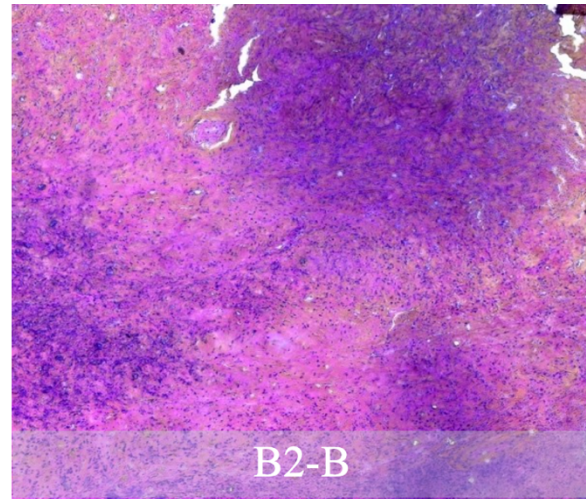
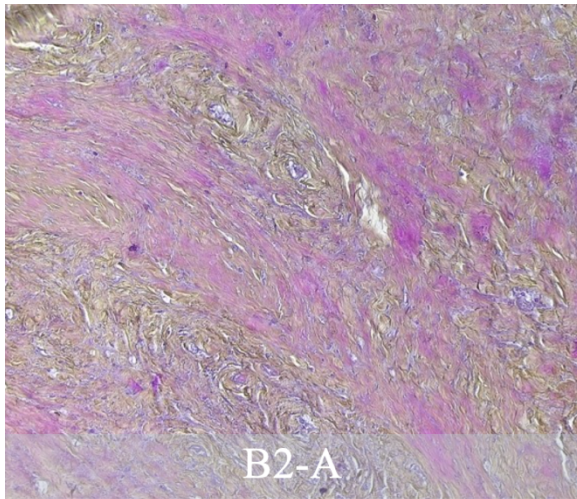
med drag av bindevev og noen få, spredte cellekjerner (**bilde 4, B-C**). I skillet mellom de nekrotiske og cellerike områdene ble det observert ringformede strukturer med et tykt lag av celler rundt (**bilde 4, C**). En struktur som var gjentakende i alle vevsblokkene var de åpne, sirkulære hulrommene. Spredt i de nekrotiske, cellefattige områdene var det også mulig å se mørkegule, ovale strukturer med brunlige, mørke korn og noen nakne cellekjerner. Dette acellulære materialet, kunne minne om pussansamlinger (**bilde 4, D**).



Bilde 4. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsblokken. A: Bildet viser en tumorutvekst fra vevet. **B:** Bildet viser en større ansamling av nakne, forstørrede cellekjerner (lilla), som grenser mot et mer cellefattig, nekrotisk område (rosa). **C:** Bildet viser et skille mellom et nekrotisk, cellefattig område (rosa), samt et område som inneholder litt mer celler (mørkelilla). **D:** Bildet viser gule, ovale strukturer med mørkebrune korn og cellekjerner. Alle bildene ble tatt med 10X-objektiv.

4.2.2.2 B₂ og B₃

I snittet fra B₂ ble det observert store cellefattige, nekrotiske, rosa områder med infiltrasjon av store mengder lineært, ustrukturert bindevev (**bilde 5, A**). Enkelte av de nekrotiske områdene inneholdt noen celleansamlinger med forstørrede, nakne cellekjerner, samt drag av bindevev (**bilde 5, B**). I snittet ble det også observert noen ringformede strukturer med bindevev rundt. I snittet fra B₃ ble det observert noen mørkegule strukturer med brune, mørke korn inni. Dette er et acellulært materiale, som kunne minne om pussansamlinger. Det var også mulig å observere en del nakne, forstørrede cellekjerner (**bilde 5, C**). Nederst i området med de mørkegule strukturene ble det observert flere lag med mer flatklemte celler med et omriss av en rødlig farge, hvor enkelte av cellene hadde en flatere cellekjerne og cytoplasma, mens andre celler hadde mistet kjernen sin. Dette ble ikke observert i snittet fra B₂. I et annet område av snittet fra B₃ ble det observert et tydelig skille mellom et cellerikt område med en stor ansamling av nakne, forstørrede cellekjerner, og et nekrotisk cellefattig område (**bilde 5, D**). Det var mulig å se noe fargenedslag i form av mørkelilla, sirkulære artefakter, samt noen vanndråper i begge snittene. Felles for begge blokkene var at det ble observert noen hvite striper, noe som gikk igjen i flere av B-blokkene.

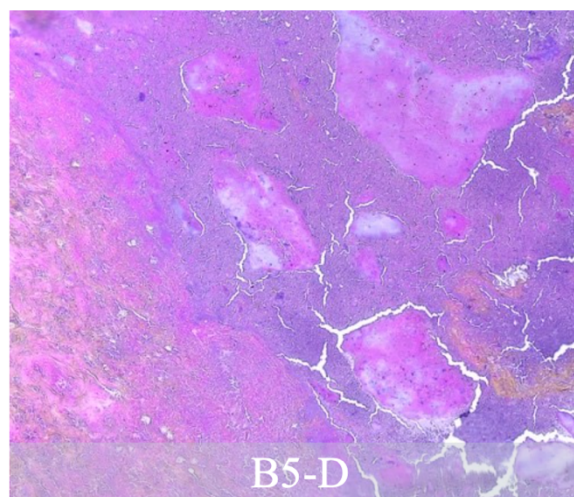
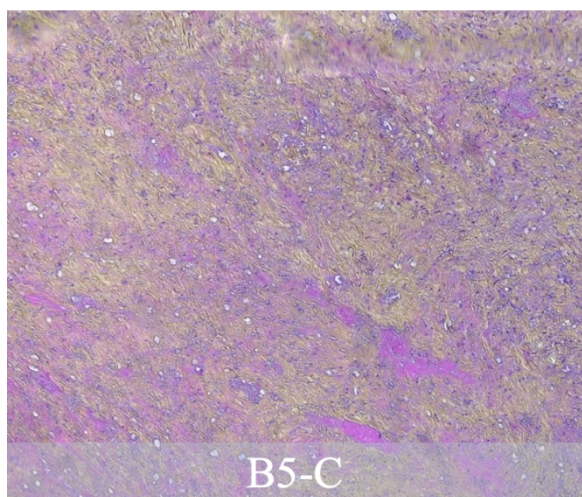
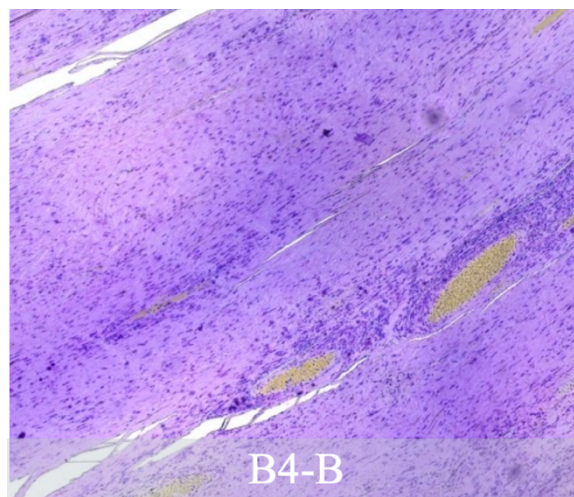
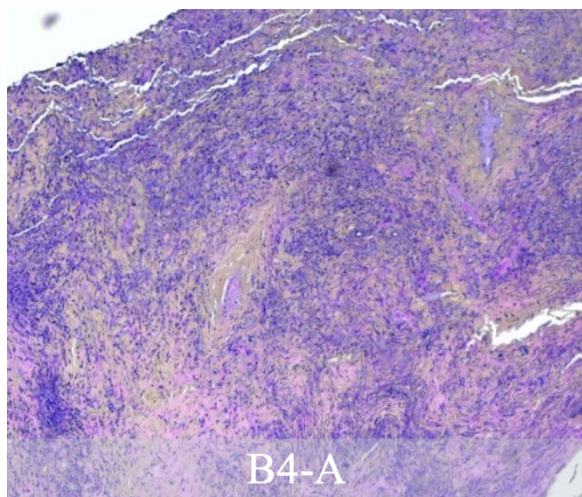


Bilde 5. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturerne som ble funnet i vevsblokkene B₂ (øverst) og B₃ (nederst). A: Bildet viser et nekrotisk, cellefattig område med mye ustrukturert bindevev. **B:** Bildet viser et rosa, nekrotisk område med både spredte nakne, forstørrede cellekjerner, samt ansamlinger av disse. **C:** Bildet viser de mørkegule strukturerne som inneholdt brune korn og noen nakne cellekjerner, samt de flatklemte cellene med rødt omriss helt nederst. **D:** Bildet viser et tydelig skille mellom et cellerikt område med store ansamlinger av nakne, forstørrede cellekjerner, og et mer nekrotisk, cellefattig område med noen spredte, nakne cellekjerner. Alle bildene ble tatt med 10X-objektiv.

4.2.2.3 B₄ og B₅

I snittet fra B₄ ble det observert et cellerikt område med mange nakne, forstørrede cellekjerner. Mellom områdene med de nakne cellekjernene var det mulig å se områder med begynnende nekrose i form av kraftige drag med ustrukturert bindevev og rosa, lyse områder uten celler. Mellom noe av bindevevet var det mulig å se enkelte ringformede strukturer, hvor bindevevet omkranset disse (**bilde 6, A**). I snittet fra B₄ var det også mulig å se mer cellefattige områder med spredte, nakne og forstørrede cellekjerner. I disse områdene ble det igjen observert strukturer som minnet om pussansamlinger, hvor disse var omgitt av en ring

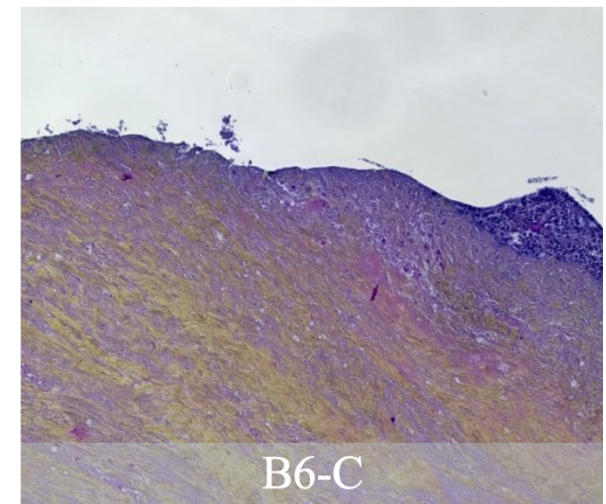
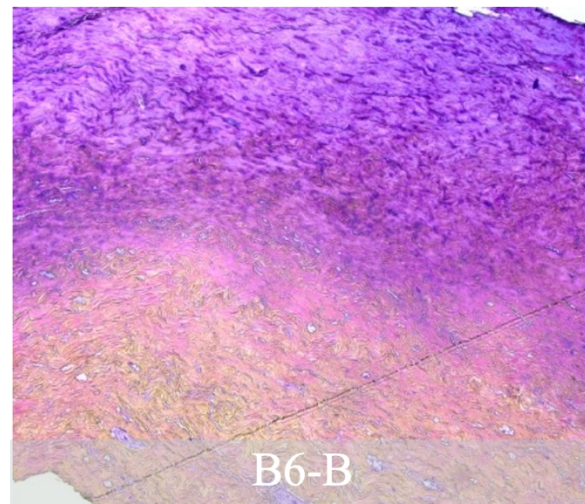
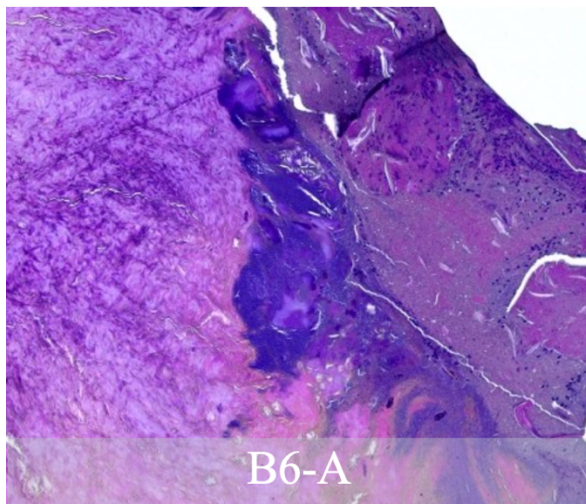
av nakne cellekjerner (**bilde 6, B**). Ved mikroskopering av snittet fra B₅ ble det observert flere rosa, nekrotiske områder fulle i ustrukturert bindevev (**bilde 6, C**). Spredt i det nekrotiske området var det mulig å se noen strukturer uten cellekjerner som var kraftigere rosa enn det omkringliggende vevet, og som kunne minne om strukturen til muskulatur. I tillegg til nekrotiske områder ble det funnet områder med tydelig skille mellom vev som allerede var nekrotisk, og vev som holdt på å bli nekrotisk (**bilde 6, D**). Det var flere sirkulære, åpne hulrom spredt i det nekrotiske vevet (**bilde 6, C-D**).



Bilde 6. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsblokkene B₄ (øverst) og B₅ (nederst). A: Bildet viser et cellerikt område med mange nakne, forstørrede cellekjerner. **B:** Bildet viser flere pussansamlinger omkranset av nakne, forstørrede cellekjerner. **C:** Bildet viser et nekrotisk område rikt med ustrukturert bindevev. **D:** Bildet viser et nekrotisk område med mindre bindevev og kraftigere rosa farge, samt et tydelig skille mellom nekrotisk område og et område som holder på å bli nekrotisk. Alle bildene ble tatt med 10X-objektiv.

4.2.2.4 B₆

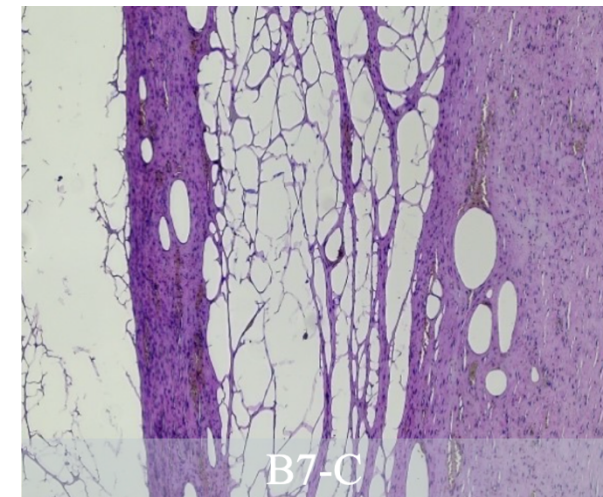
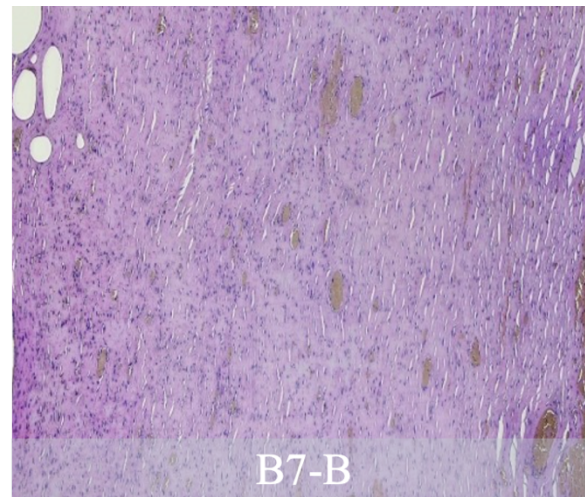
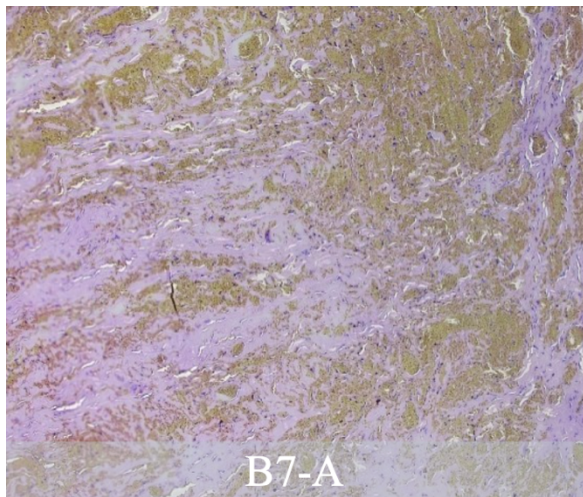
I snittet fra B₆ var det mulig å observere områder som både var rike og fattige på celler, og blokken hadde et varierende cellebilde. I et område av snittet var det mulig å se en større tumorutvekst, hvor den ene delen av tumoren inneholdt noen forstørrede, nakne cellekjerner, og den andre delen inneholdt mer nekrotisk, cellefattig vev. Under tumoren var det mulig å se et cellefattig, nekrotisk område med noe bindevev (**bilde 7, A**). I andre deler av vevet ble det observert områder med en tydelig grense mellom vev som var cellefattig og nekrotisk med mye ustrukturert bindevev, og områder som inneholdt noen få, spredte nakne cellekjerner som begynte å bli nekrotisk (**bilde 7, B**). Vevet hadde flere tumorutvekster med noen karakteristiske forskjeller, hvor den andre tumorutveksten som ble observert hadde en større ansamling av nakne, forstørrede cellekjerner, samt vev med en større andel ustrukturert bindevev under (**bilde 7, C**).



Bilde 7. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsblokken fra B₆. A: Bildet viser den ene tumorutveksten med en liten ansamling nakne, forstørrede cellekjerner, med nekrotisk vev under. **B:** Bildet viser skillet mellom begynnende nekrotisk vev og vev rikt på bindevev som allerede har blitt nekrotisk. **C:** Bildet viser den andre tumorutveksten som ble observert, som var rik på nakne, forstørrede cellekjerner, og som vokste ut fra et område som inneholdt mye ustrukturert bindevev. Alle bildene ble tatt med 10X-objektiv.

4.2.2.5 B₇

Det ble funnet flere områder med nekrotisk vev rikt på acellulært materiale, som kunne minne om puss, sammenliknet med tidligere blokker (**bilde 8, A**). De nekrotiske områdene hadde større ansamlinger av puss, hvor pussansamlingene ikke lenger kun var ovale strukturer, men som dekket større områder i det nekrotiske vevet. Mellom pussansamlingene kunne det observeres noen få spredte, nakne cellekjerne (**bilde 8, B**). Det ble i tillegg observert noen større, fargeløse «spindelvev»-aktige strukturer, som kunne minne om de strukturene man finner hos adipocytter og i øvre del av adventitia serosa (**bilde 8, C**).

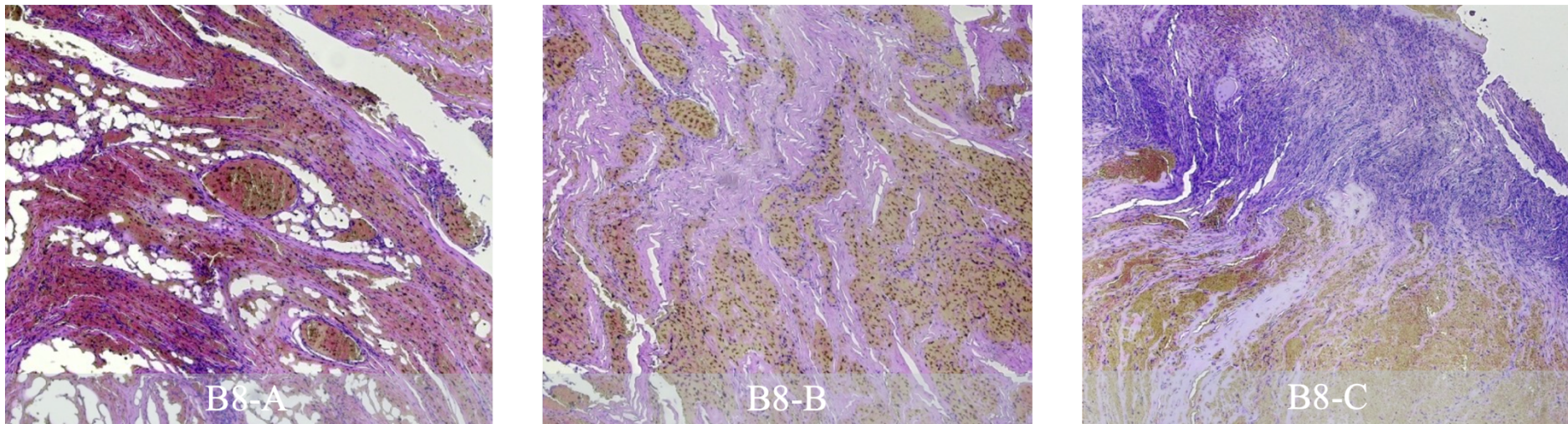


Bilde 8. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsblokken fra B₇. A: Bildet viser et nekrotisk område rikt på pussansamlinger. **B:** Bildet viser et nekrotisk område med avgrensede pussansamlingene. **C:** Bildet viser de «spindelaktige» strukturene som kunne minne om fettceller eller bindevev. Alle bildene ble tatt med 10X-objektiv.

4.2.2.6 B₈

I snittet fra B₈ ble det observert flere nekrotiske områder med store pussansamlinger, hvor det nekrotiske vevet hadde en kraftigere rosafarge sammenliknet med de tidligere snittene. I det samme området ble det observert flere av de «spindelnev»-aktige strukturene (**bilde 9, A**).

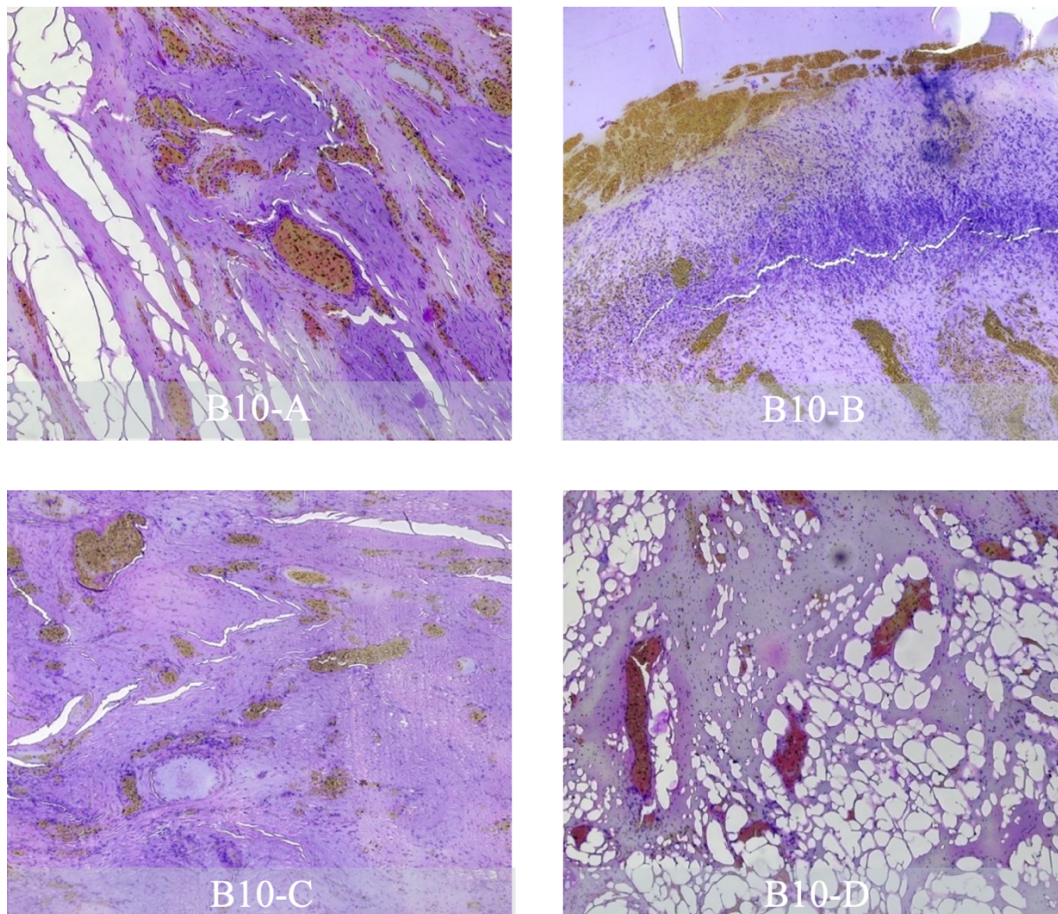
Pussansamlingene som ble observert inneholdt en del nakne, forstørrede cellekjerne (**bilde 9, B**). I motsetning til snittet til B₇ ble det i snittet til B₈ observert store områder med cellerikt vev, hvor cellene hadde en forstørret, naken cellekerne (**bilde 9, C**).



Bilde 9. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsblokken fra B₈. A: Bildet viser et nekrotisk område med mye puss og strukturer som kan minne om fettceller eller bindevev. **B:** Bildet viser et nekrotisk område med mye puss. **C:** Bildet viser et område med et tydelig skille mellom et nekrotisk område med puss (nederst) og et cellerikt område med store ansamlinger av nakne, forstørrede cellekjerne (øverst). Alle bildene ble tatt med 10X-objektiv.

4.2.2.7 B₁₀

I B₁₀ ble det observert celledfattige, nekrotiske områder med mange pussansamlinger, hvor en del av disse var farget noe rosa (**bilde 10, A**). Mellom områdene med nekrotisk vev ble det observert cellerike områder med forstørrede, nakne cellekjerner, hvor celleansamlingen i ett av disse områdene ble observert som en slags stripe på midten (**bilde 10, B**). I flere av de nekrotiske områdene ble det observert spredte, nakne og forstørrede cellekjerner, pussansamlinger, samt sirkulære strukturer med noen cellekjerner, noe som kunne minne om blodårer (**bilde 10, C**). Det ble i tillegg observert noen større, fargeløse «spindelvev»-formede strukturer, noe som kunne minne om de strukturene man finner hos adipocytter og i øvre del av adventitia serosa (**bilde 10, D**).

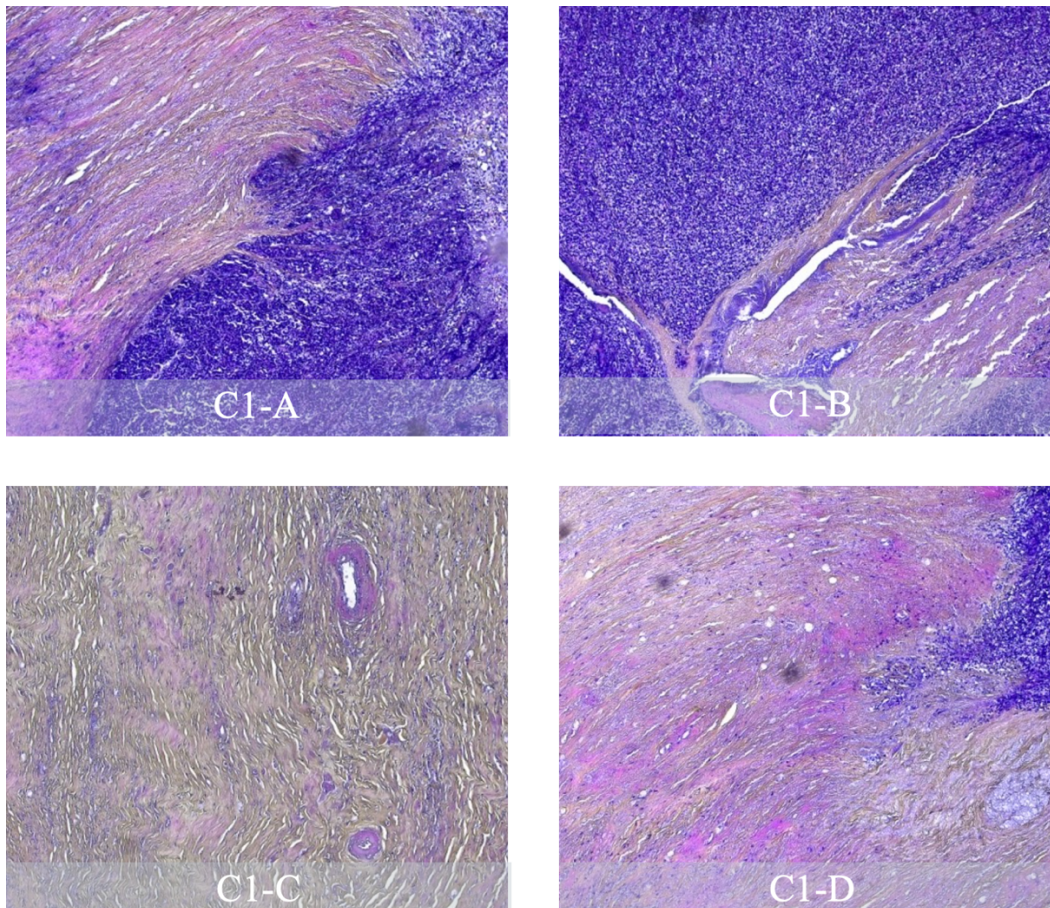


Bilde 10. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsbløkken fra B₁₀. **A:** Bildet viser et område med «spindelvev»-formede strukturer og avgrensede pussansamlinger. **B:** Bildet viser et område med en stripe av nakne, forstørrede cellekjerner i midten og mer nekrotisk vev over og under. **C:** Bildet viser et nekrotisk område med puss, samt en ringstruktur i sentrum av bildet som kan likne en blodåre. **D:** Bildet viser mer av de «spindelvev»-formede strukturene som ble observert. Alle bildene ble tatt med 10X-objektiv.

4.2.3 Biopsier under behandling (C-blokkene)

4.2.3.1 C₁

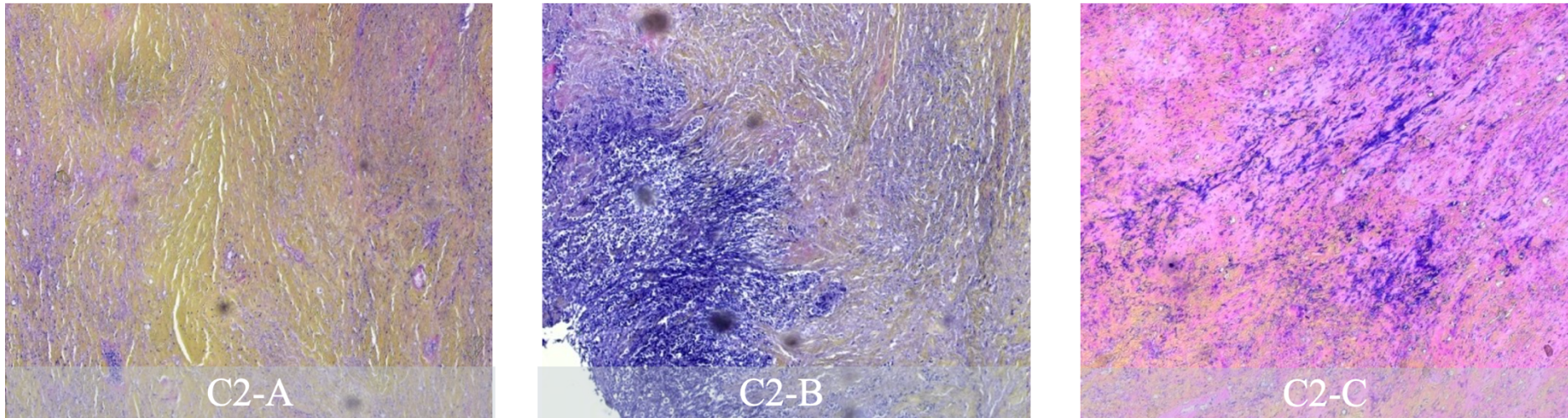
I snitt fra C₁ ble det observert flere nekrotiske områder med bindevev, samt noen områder som var mer cellerike. Det ble også observert noen hvite striper og åpne hulrom, noe som gikk igjen i flere av C-blokkene. I deler av snittet var det mulig å observere tydelige skiller mellom celfattig, nekrotisk vev med lineært bindevev og mer cellerike områder med forstørrede, nakne cellekjerner (**bilde 11, A-B**). Andre deler av vevet var mer dominert av mye lineært, ustrukturert bindevev, samt en ringformet, rosa struktur i midten som kunne minne om en blodåre (**bilde 11, C**). I de nekrotiske områdene ble det observert bindevev som både var lineært og mer strukturert, samt bindevev som var mer ustrukturert (**bilde 11, D**). I samme område ble det observert et cellerikt område bestående av forstørrede, nakne cellekjerner. Artefakter i form av vanddråper og fargenedslag kunne observeres i deler av snittet. Det ble i tillegg observert noen hvite striper og åpne hulrom, som gikk igjen i flere av C-blokkene.



Bilde 11. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsbløkken fra C₁. A: Bildet viser et tydelig skille mellom nekrotisk og cellerikt vev. **B:** Bildet viser et område med en stor ansamling av forstørrede, nakne cellekjerner. **C:** Bildet viser et område svært rikt på ustrukturert bindevev. **D:** Bildet viser et nekrotisk område med en del bindevev. Alle bildene ble tatt med 10X-objektiv.

4.2.3.2 C₂

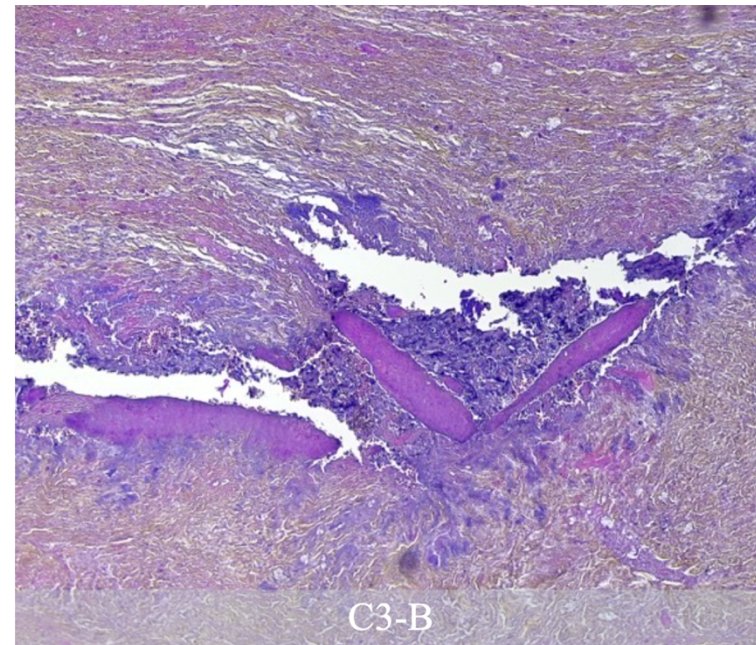
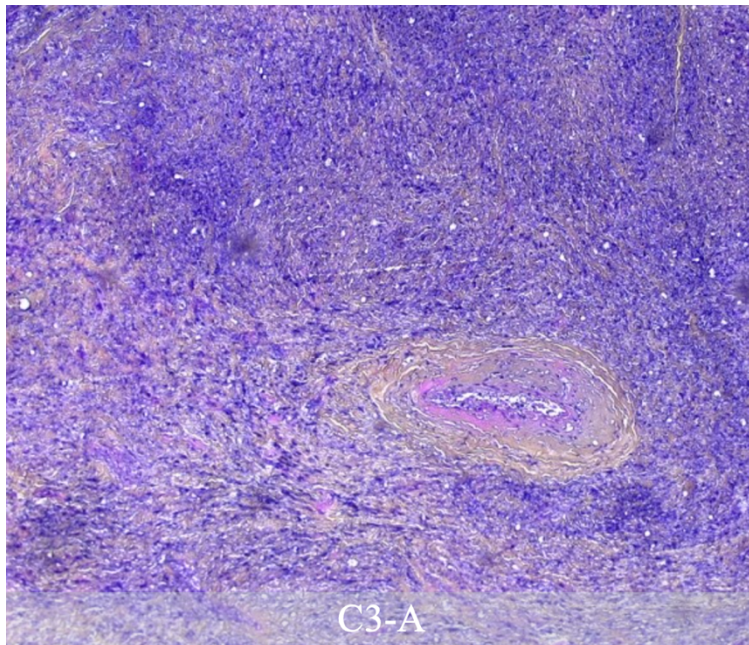
Snittet fra C₂ var dominert av lineært bindevev, hvor enkelte områder viste mindre grad av struktur enn andre. Det var mulig å observere enkelte spredte, nakne cellekjerner i bindevevet (**bilde 12, A**). I andre deler av snittet var det flere cellerike områder med større celleansamlinger bestående av forstørrede, nakne cellekjerner som var kraftig mørkeblå, og som grenset mot mer cellefattige, nekrotiske områder med mye lineært bindevev (**bilde 12, B**). Det ble observert flere nekrotiske områder, hvor disse var farget kraftig rosa og inneholdt flere spredte, små ansamlinger med forstørrede nakne cellekjerner (**bilde 12, C**). Spredt i de nekrotiske områdene kunne det observeres flere strukturer som minnet om blodårer. Det kunne også sees enkelte artefakter i form av vanddråper i flere av bildene.



Bilde 12. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsblokken fra C₂. A: Bildet viser mye lineært bindevev med noen spredte, nakne cellekjerner. **B:** Bildet viser overgangen fra et cellerikt område med forstørrede, nakne cellekjerner til et cellefattig område med ustrukturert bindevev. **C:** Bildet viser et nekrotisk vevsområde med noen spredte forstørrede, nakne cellekjerner. Alle bildene ble tatt med 10X-objektiv.

4.2.3.3 C₃

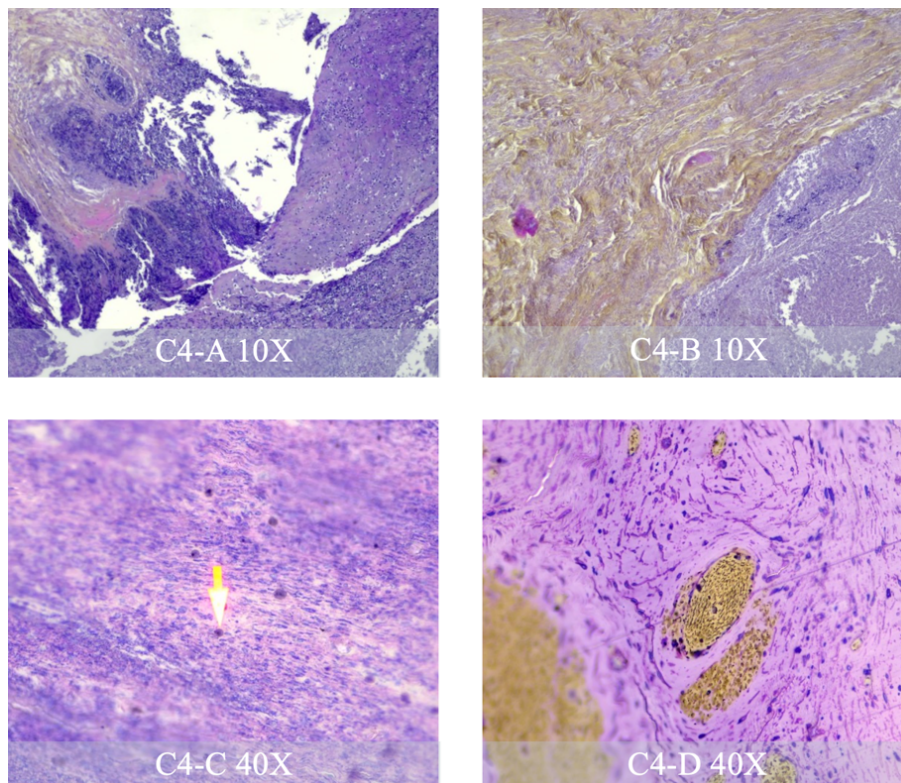
I snittet fra C₃ ble det observert store områder med nekrotisk vev og bindevev, samt noen områder med mer cellerikt vev. Områdene som var rike på forstørrede, nakne cellekjerner hadde noen drag av delvis strukturert bindevev (**bilde 13, A**). I det samme området ble det observert en ringformet struktur omkranset med bindevev og med cellekjerner i midten, noe som kun minner om en blodåre (**bilde 13, A**). I andre deler av vevet var det mer nekrotiske områder med mye bindevev og få til ingen cellekjerner (**bilde 13, B**). I dette området var bindevevet noe lineært og strukturert enkelte steder, mens det i andre deler var mer ustrukturert. Mellom det strukturerte og det ustrukturerte bindevevet kunne det sees en liten ansamling av nakne, forstørrede cellekjerner. Mellom de nakne cellekjernene kunne det sees noen ovale, magentafargede strukturer.



Bilde 13. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsbløkken fra C₃. A: Bildet viser et område som er svært cellerikt med forstørrede, nakne cellekjerner. I midten av bildet sees det en ringformet struktur som kan minne om en blodåre. **B:** Bildet viser det et nekrotisk område med mye bindevev, hvor bindevevet øverst er lineært og bindevevet nederst er mer ustrukturert. Mellom bindevevet kan det sees en liten ansamling av cellekjerner. Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

4.2.3.4 C₄

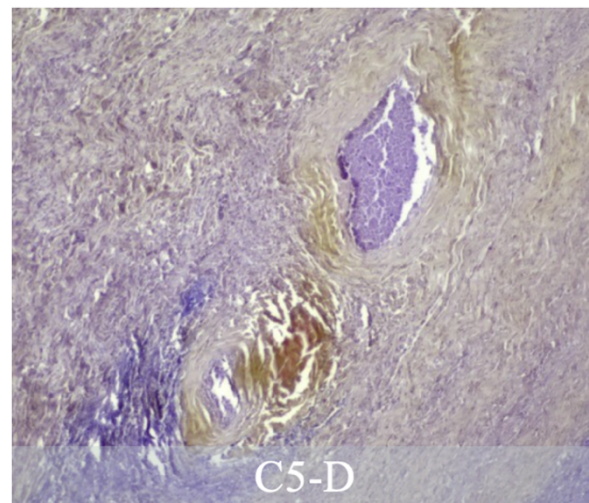
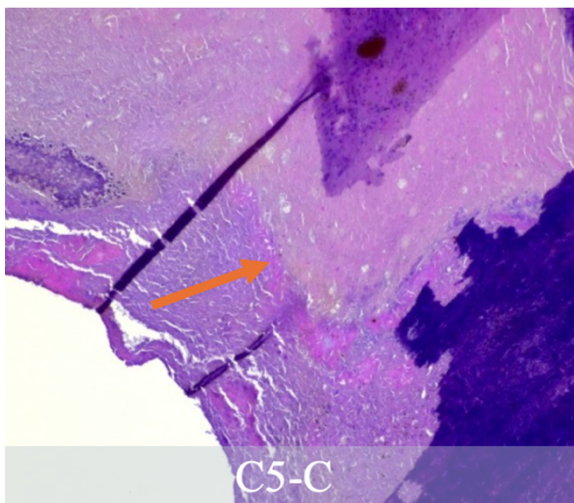
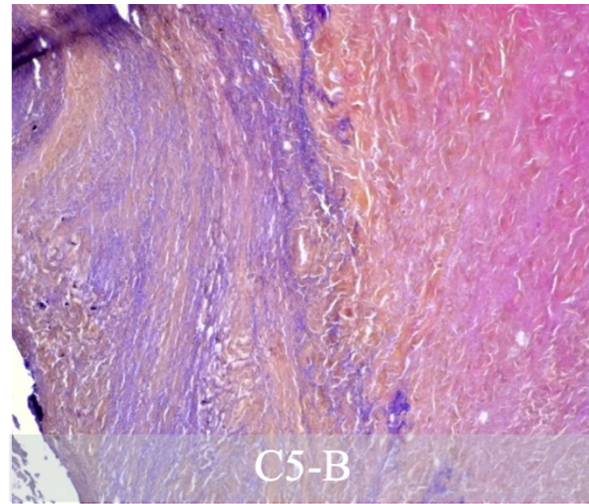
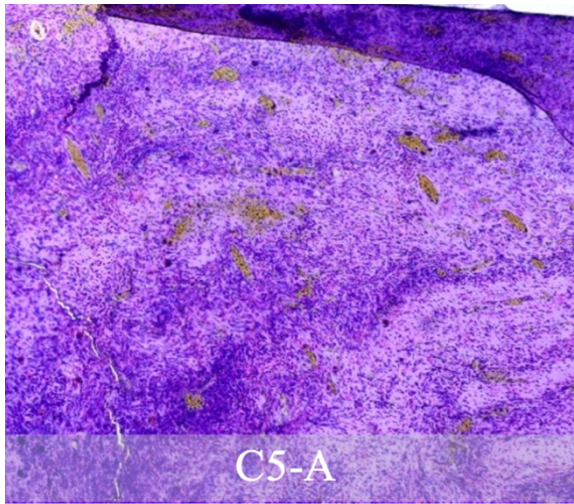
I snittet fra C₄ ble det observert enkelte områder med store ansamlinger av forstørrede, nakne cellekjerner omkranset av noe nekrotisk, cellefattig vev med mer spredte cellekjerner og drag av bindevev (**bilde 14, A**). I de cellerike områdene kunne man se strukturer som minnet om blodårer, mens man i det nekrotiske området kunne se muskulatur som hadde fått en kraftigere rosa farge (**bilde 14, A**). I andre deler av snittet var det mulig å se tydelige overganger mellom cellefattige områder som holdt på å bli nekrotiske, og områder som allerede var nekrotisk med mye lineært bindevev og få celler (**bilde 14, B**). Spredt i det nekrotiske området kunne man med 40X-objektiv se noen spredte celler som fortsatt inneholdt cytoplasma, og som hadde forstørret kjerne (økt N/C-ratio) (**bilde 14, C**). Cellene oppstod både i grupperinger og enkeltvis. Dette var den første C-blokken hvor det ble observert flere gule acellulære materialer med mørke korn, som kunne minne om pussansamlinger. Disse befant seg i et nekrotisk, cellefattig område (**bilde 14, D**). Rundt pussansamlingene hadde det lagt seg noen nakne, forstørrede cellekjerner, og det var mulig å se flere celler med økt N/C-ratio prest i det nekrotiske vevet (**bilde 14, C**).



Bilde 14. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsblokken fra C₄. **A:** Bildet viser en blanding mellom nekrotisk vev og cellerikt vev med nakne, forstørrede cellekjerner. **B:** Bildet viser overgangen mellom et område rikt på mye lineært bindevev, og et cellefattig område som holder på å bli nekrotisk. **C:** I bildet viser pilen en celle med økt N/C-ratio, samt mye nekrotisk vev. **D:** Bildet viser store ansamlinger med puss omkranset av celler med økt N/C-ratio. Bildene øverst er tatt med 10X-objektiv, og bildene nederst er tatt med 40X-objektiv.

4.2.3.5 C₅

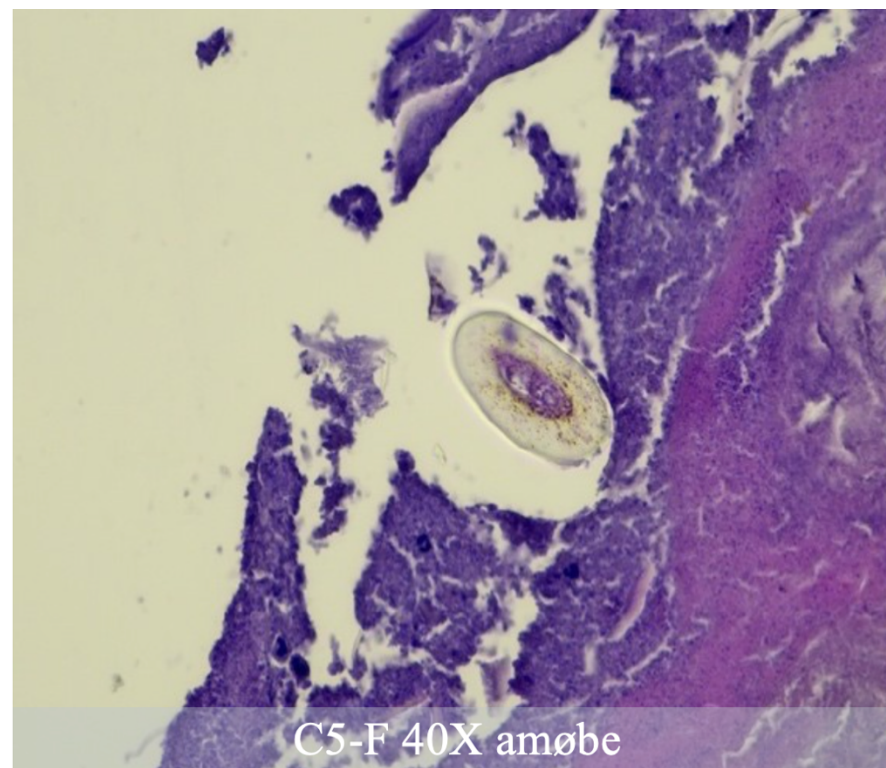
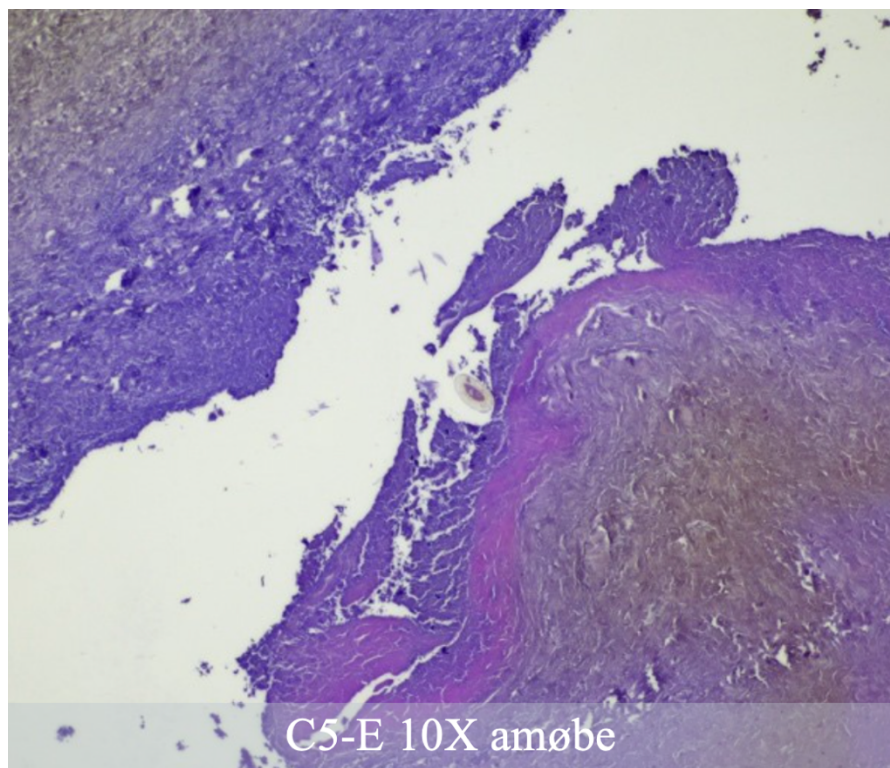
I snittet fra C₅ ble det observert flere ovale, mørkegule strukturer med mørkebrune korn, noe som kunne minne om pussansamlinger. Spredt rundt omkring i snittet kunne man se store ansamlinger av forstørrede, nakne cellekjerner (**bilde 15, A**). I andre områder av snittet var vevet mer nekrotisk og cellefattig, hvor det også ble observert områder med tydelig skille mellom vev som allerede var nekrotisk med en del lineært bindevev, og vev som holdt på å bli nekrotisk som var sterkere rosa og ikke inneholdt like mye bindevev (**bilde 15, B**). Vevet som var farget sterkt rosa og som holdt på å bli nekrotisk hadde en liknende struktur som muskulatur. I et område av snittet nært det som kunne minne om strukturen til en fortykket epidermis ble det observert en struktur som likner en papillae-formasjon i dermis, som var cellefattig og befant seg i et nekrotisk område (**bilde 15, C**). Nær papillae-formasjonen var det et tydelig skille mellom vev som var nekrotisk med drag av bindevev, og cellefattig vev som holdt på å bli nekrotisk. Som med tidligere vevsblokker ble det observert områder med store ansamlinger av bindevev, hvor det i enkelte områder var lineært og ustrukturert, mens andre var mer strukturerte og bølgete (**bilde 15, D**). I midten mellom det lineære og bølgete bindevevet ble det observert to ringformede, lilla strukturer omkranset av bindevev, noe som kunne minne om strukturen til blodårer.



Bilde 15. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsblokken fra C₅. A: Bildet viser flere pussansamlinger, samt ansamlinger av celler og nekrotisk vev. **B:** Bildet viser et tydelig skille mellom vev som allerede er nekrotisk (rosa) og vev som holder på å bli nekrotisk (lilla). **C:** Bildet viser det som minner om en papillae-formasjon i det nekrotiske vevet (orange pil). **D:** Bildet viser et område rikt på bindevev, hvor bindevevet øverst er bølgete og noe ustrukturert, mens bindevevet nederst er lineært. I midten av det samme bildet vises de to ringformede strukturene. Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

Ved videre mikroskopering av snittet fra C₅ ble det observert et fremmedlegeme av ukjent opprinnelse i et vevsområde som holdt på å bli nekrotisk (**bilde 16, E**). Fremmedlegemet var ovalt, hadde blankt cytoplasma og en mørkelilla, oval kjerne. Ved mikroskopering med 40X-objektiv ble det observert en gul «ring» rundt den mørkelilla kjernen (**bilde 16, F**).

Fremmedlegemet hadde liknende kjennetegn som de som sees hos amøber.

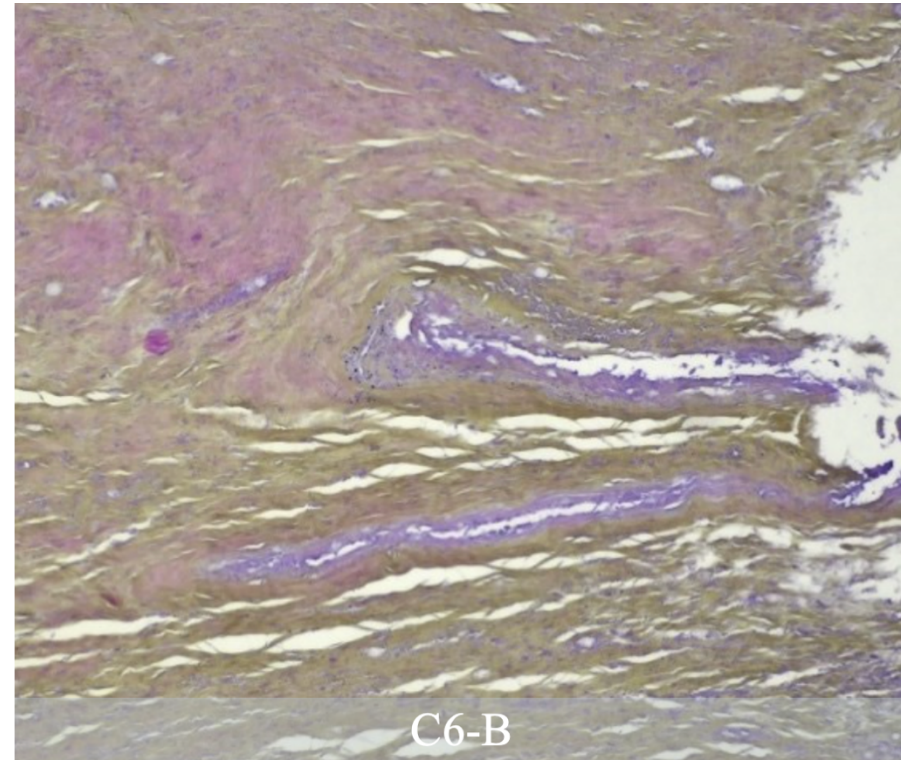
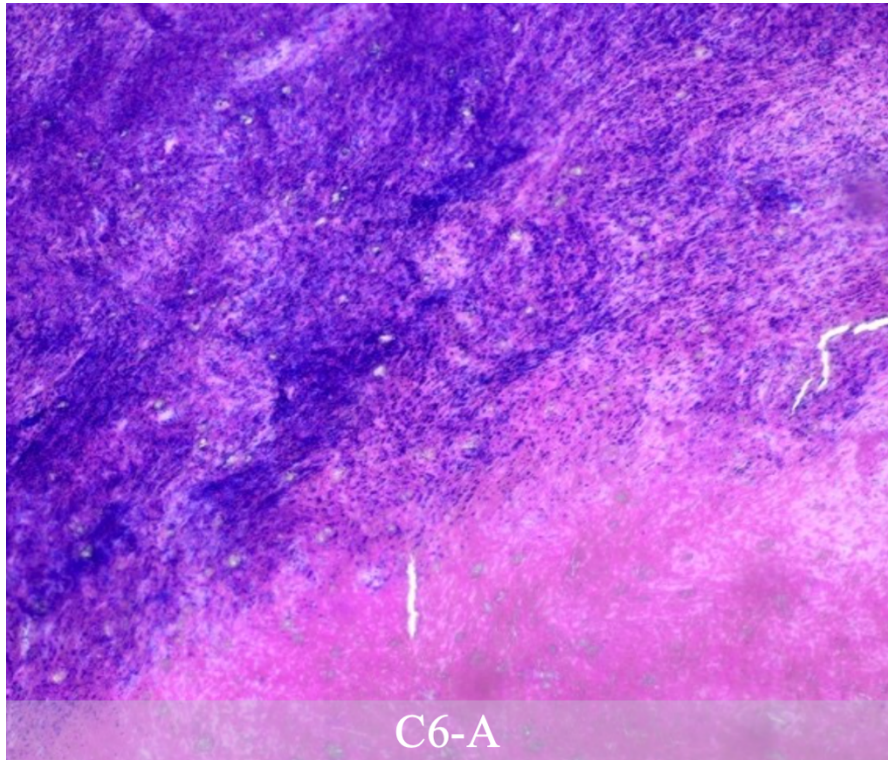


Bilde 16. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsblokken fra C₅. E: Bildet viser fremmedlegemet ved 10X-objektiv. **F:** Bildet viser fremmedlegemet ved 40X-objektiv. Fremmedlegemet hadde samme kjennetegn som de som sees hos amøber.

4.2.3.6 C₆

Snittet fra C₆ inneholdt store mengder rosa, nekrotisk vev, hvor det var mulig å finne tydelige skiller mellom områder som var nekrotisk og områder med større ansamlinger av forstørrede, nakne cellekjerner (**bilde 17, A**). I andre deler av vevet var det områder med mye bindevev, hvor noe av bindevevet var mer lineært, mens andre deler var mer «bølgete» og befant seg i et nekrotisk, cellefattig område (**bilde 17, B**). I det samme

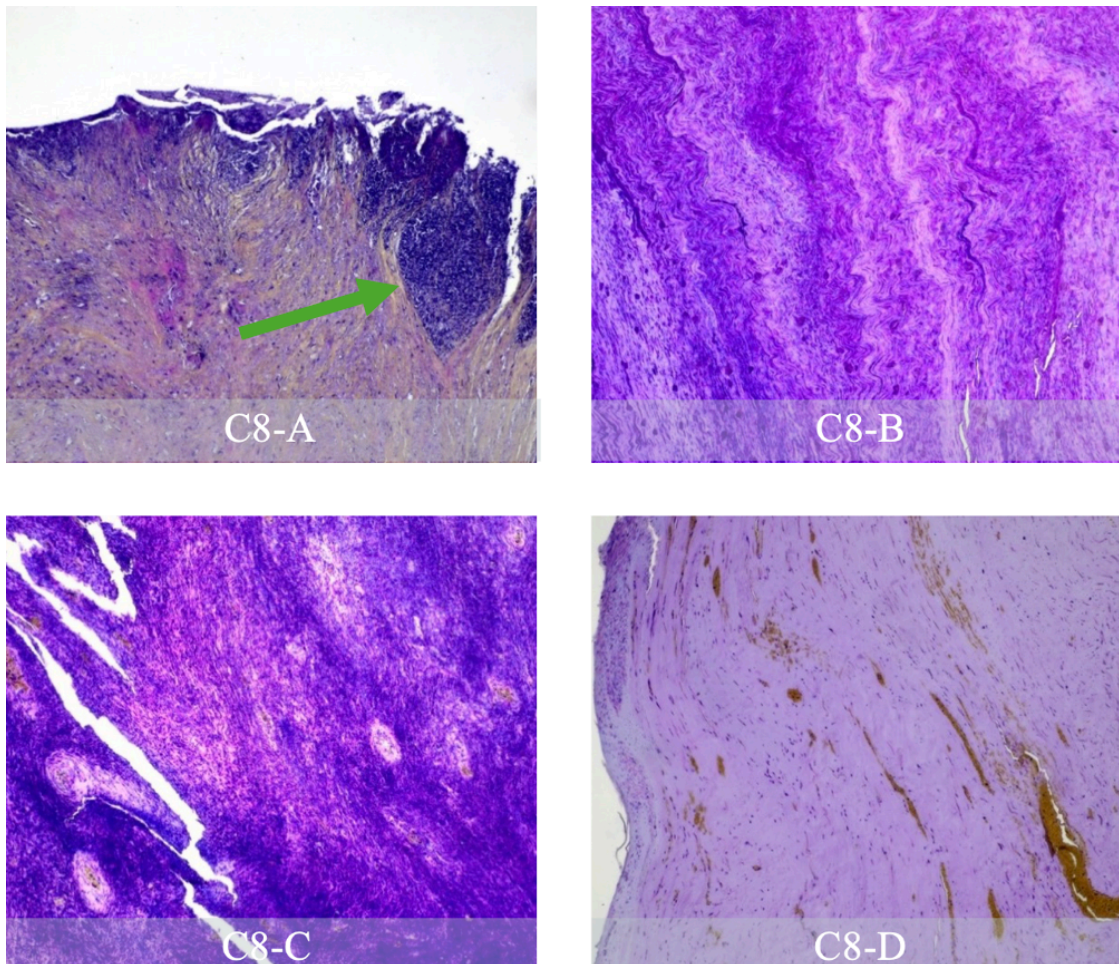
området ble det observert noen ovale, mørkelilla strukturer omkranset av celler med små cellekjerner og noe cytoplasma, og kunne minne om blodårer (**bilde 17, B**).



Bilde 17. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsblokken fra C6. A: Bildet viser overgangen mellom cellerikt vev (mørkelilla) og celledattig, nekrotisk vev (rosa). **B:** Bildet viser et nekrotisk, celledattig område med mye lineært bindevev. Her ble det også observert en struktur som likner en blodåre. Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

4.2.3.7 C₈

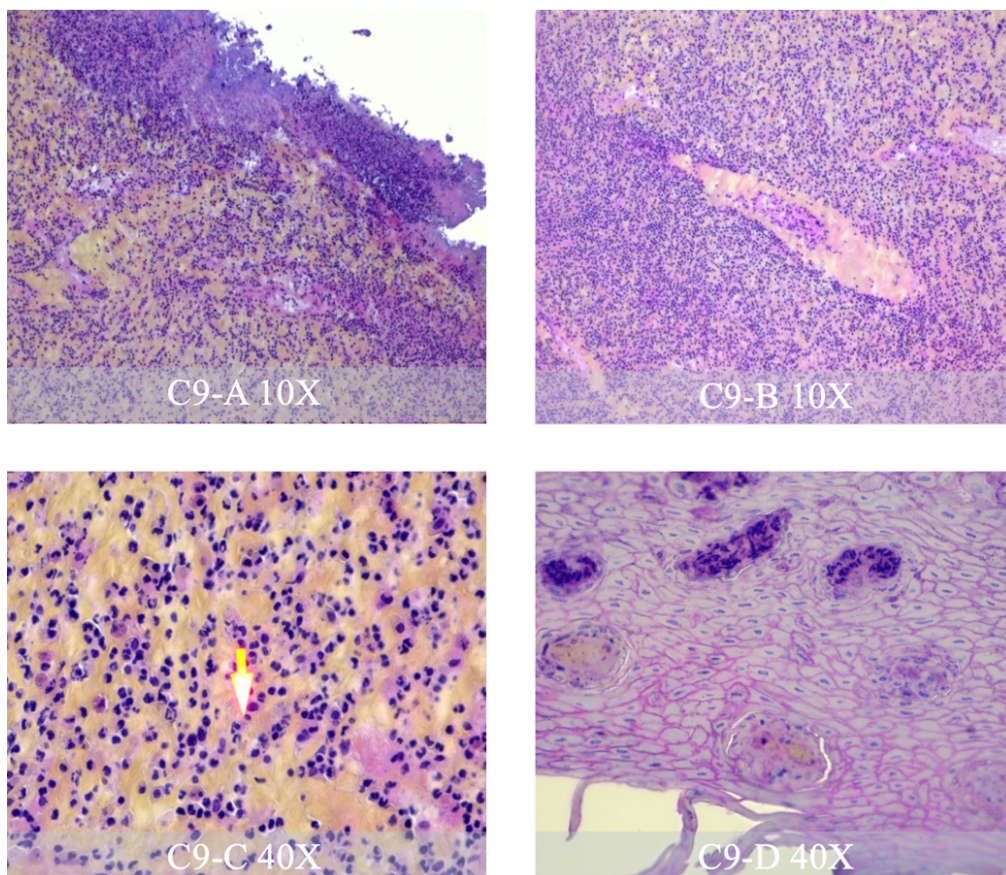
I snittet fra C₈ ble det observert flere store cellefattige, nekrotiske områder (lyserosa) og områder med store ansamlinger av nakne, forstørrede cellekjerner, samt mye bindevev. I ett av områdene var det mulig å se den tydelige overgangen mellom cellerikt og nekrotisk vev (**bilde 18, A**). I det cellerike området var det ansamlinger av nakne, forstørrede cellekjerner øverst i snittet, hvor det også kunne sees en struktur som minnet om en papillae-formasjon, mens det i det nekrotiske området var drag av lineært bindevev (**bilde 18, A**). Videre i snittet ble det observert områder som holdt på å bli nekrotisk, og som var både lineært og bølgete i strukturen (**bilde 18, B**). I disse områdene var det mulig å se noen klaser av nakne, forstørrede cellekjerner, samt lyserosa, ovale strukturer som kunne minne om blodårer (**bilde 18, C**). I de nekrotiske, cellefattige områdene ble det observert flere pussansamlinger, samt noen spredte, små, nakne cellekjerner (**bilde 18, D**).



Bilde 18. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsbløkken fra C₈. **A:** Bildet viser overgangen mellom cellerikt område (øverst) og nekrotisk område (nederst). I det cellerike området kunne man se det som minnet om en papillae-formasjon (grønn pil). **B:** Bildet viser et nekrotisk område med lite struktur og noen ansamlinger av nakne, forstørrede cellekjerner. **C:** Bildet viser store ansamlinger av celler, samt strukturer som likner på arterier og vener. **D:** Bildet viser et nekrotisk, cellefattig område med mye mørkegule strukturer som likner pussansamlinger. Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

3.2.3.8 C₉

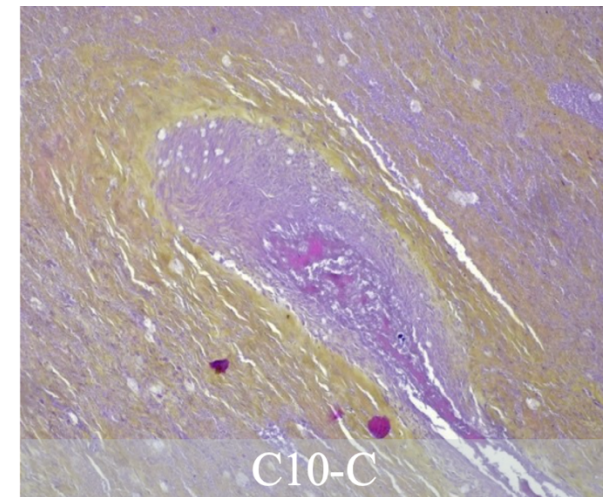
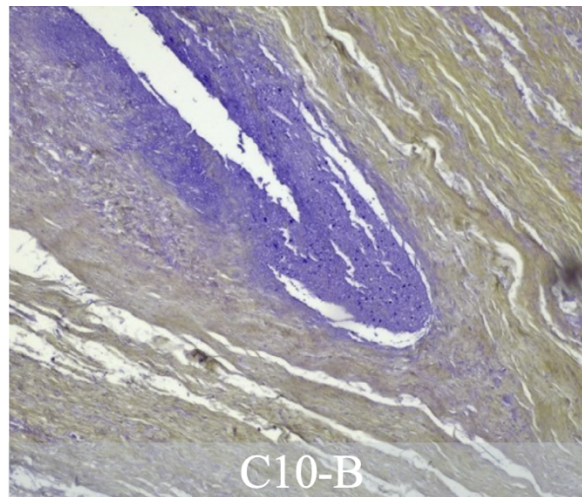
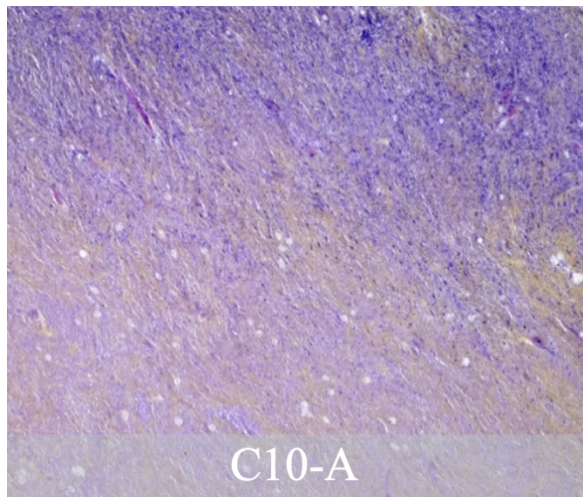
I snittet fra C₉ ble det observert flere cellerike områder, samt få områder med nekrotisk vev. I de cellerike områdene ble det observert en kraftig, safranfarget bakgrunn, hvor cellene lå spredt (**bilde 19, A**). I det samme området ble det observert det som kunne minne om en utvekst, hvor denne bestod av nakne, forstørrede cellekjerne. I et annet cellerikt område ble det observert en oval-formet, lyserosa struktur med noen celler i midten, hvor strukturen kunne minne om en blodåre (**bilde 19, B**). I de cellerike områdene ble det observert både nakne celler med forstørret cellekjerne, samt celler med økt N/C-ratio og noen vakouler (**bilde 19, C**). Nederst i snittet ble det funnet et område med mange cellelag bestående av flatklemte celler med rødt omriss, hvor noen celler hadde en delvis økt cellekjerne, og andre celler hadde mistet kjernen sin. Cellene ble flatere jo nærmere de kom kanten av vevet (**bilde 19, D**). Spredt mellom de flatklemte cellene kunne det observeres noen ringformede strukturer bestående av celler med økt N/C-ratio.



Bilde 19. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsbløkken fra C₉. **A:** Bildet viser et cellerikt område bestående av mange nakne, forstørrede cellekjerne spredt i en safranfarget bakgrunn. Ut fra overflaten til vevet sees også det som likner en tumorutvekst. Bildet er tatt med 10X-objektiv. **C:** Bildet viser det samme området med 40X-objektiv, hvor man tydelig kan se de ulike cellene. **B:** Bildet viser et annet cellerikt område med det som kan minne om en blodåre (tatt med 10X-objektiv). **D:** Bildet viser området med de flatklemte cellene med rødlig omriss og noe økt cellekjerne. Bildet er tatt med 40X-objektiv.

4.2.3.9 C₁₀

Cellebildet til C₁₀ var dominert av mye drag av lineært, gult bindevev. Store deler av snittet var cellefattig, og hadde kun noen få spredte, nakne cellekjerner. Det ble observert et område hvor overgangen mellom det nekrotiske, cellefattige område og et mer cellerikt område som holdt på å bli nekrotisk var svært tydelig (**bilde 20, A**). I et annet område ble det observert mye lineært bindevev med en ansamling av nakne, forstørrede celler i midten (**bilde 20, B**). I det ene cellefattige området med mye lineært bindevev kunne det observeres en oval, lyserosa struktur som kunne minne om en arterie (**bilde 20, C**). Det ble observert noe fargenedslag i form av små, sirkulære strukturer som hadde en kraftig rosa-farge (**bilde 20, A**).



Bilde 20. Bildet viser en oversikt over de ulike strukturene som ble funnet i vevsbløkken fra C₁₀. A: Bildet viser et nekrotisk, cellefattig område (nederst), og et cellerikt område som holdt på å bli nekrotisk (øverst) Her var det også mye drag i bindevevet. B: Bildet viser mye lineært bindevev, samt et mer cellerikt område i midten. C: Bildet viser et cellefattig område med mye bindevev, og en struktur som kunne minne om en blodåre. Her ble det også observert noe fargenedslag. Alle bildene ble tatt med 10X-objektiv.

4.3 RT-LAMP

BPV-2 blir ved gjentatte analyser inkonklusiv, mens resultatene var entydig negative for BPV-1 og BPV-13. Ved analysing av BPV-2 kommer det en tydelig smeltekurve, men har en inhibert amplifiseringskurve. Se **vedlegg 4** for resultatene og en oversikt over de ulike kurvene.

5 Diskusjon

5.1 Karakterisering av equint sarkom

Basert på makroskopisk utseende var vevet som ble mottatt mest forenlig med fibroblastisk sarkom, hvor typiske kjennetegn inkluderer kjøttfulle, ulcerøse sår dekket av skorper, noe som også stemte med utdelt sarkom basert på utdelte bilder (**bilde 1**). Sarkomet som ble utdelt var hentet fra lysken til en hest, som er et typisk område hvor slike sarkomer utvikles (4). Slike sarkomer kan videre deles inn i type 1 og type 2, hvor man ved type 1 ikke vil se like tydelige histologiske endringer, i motsetning til type 2 hvor det er mulig å se flere histologiske forandringer (4).

Det er problematisk å kartlegge kjente, histologiske forandringer ved slike sarkomer, da det finnes lite litteratur rundt temaet. Av den begrensede litteraturen som er tilgjengelig nevnes kjennetegn som fortykkelse av ytre del av epidermis, hyperplasi, hvirvling og papillae-dannelser (4). Det kan mistenkes at cellebildet ved en BPV-infeksjon kan ha likheter med cellebildet som oppstår ved andre virus-infeksjoner, hvor det typisk sees infiltrasjon av makrofager, lymfocytter og plasmaceller inn i det affiserte vevet, samt noe nekrose (5). For å utvide kunnskapen rundt histologiske endringer ved BPV-infeksjon ble de ulike snittene HES-farget og mikroskopert, hvor det var flere tydelige forskjeller mellom de ulike vevsblokkene, noe som kan gjenspeiles av behandlingen de har gjennomgått.

5.2 Histopatologisk kartlegging

Ved makroskopisk vurdering var A-blokkene mykere og lysere i fargen, mens B- og C-blokkene var svært tunge, svarte i fargen og harde. A-blokkene ble samlet inn i oktober 23 før oppstart av behandling, mens B- og C-blokkene ble samlet inn februar 24 etter behandling. Det at B- og C-blokkene har blitt hentet ut flere måneder senere kan forklare noe av de makroskopiske ulikhetene.

Ved mikroskopering av snittene var det utfordrende å skille epidermis og dermis fra hverandre, da det ikke var gitt informasjon om nøyaktig hvor vevsblokkene var hentet fra og hvordan de var makrobeskjært. Fra annen litteratur er det beskrevet at epidermis har et normalt tynt lag av keratiniserte celler, noe som ikke har vært mulig å identifisere direkte (17, 18). Dette gjorde det vanskelig å vurdere hvor de ulike strukturene var orientert, samt å finne igjen de få kjennetegnene som er opplyst om i litteraturen. Det ble likevel observert enkelte områder som hadde likhetstrekk med det som defineres som epidermis og dermis.

5.2.1 A-snittene

A-blokkene kom fra en del av svulsten som ble hentet ut oktober 2023, og tilhørte en sekundærsvulst som lå adskilt fra primærsvulsten. Prøvematerialet ble så makrobeskjært i fem blokker kalt A₁-A₅. Vevsbiten ble skivedelt ned mot basisfestet. A₃ var den midterste delen, mens A₂ og A₄ lå på hver sin side av A₃. Alle A-blokkene var tilstrekkelig mykt til snitting, uten behov for dekalsinering, og ble snittet på to µm. A-blokkene var generelt dominert av bindevev som hadde blitt farget gult av safran, samt en del spredte celler med økt N/C-ratio. I A₂ (**bilde 2, venstre**) ble det observert svært få celler og mye bindevev. Bindevevet så lineært ut og hadde i tillegg tendenser til å bli ustrukturert. Normalt bindevev opptrer i «bølge»-strukturer, men lineært bindevev er vanlig å se ved arrdannelse. Det ustrukturerte, lineære bindevevet kan tyde på at området var utsatt for traume, slik som utvekst av tumorvev og etterfølgende skjæring av dette, og har dermed dannet arrvev. De få cellene som ble observert lå spredt i snittet og hadde økt N/C-ratio, hvor noen av cellene liknet på makrofager. Resten av cellene har likheter med immunceller, noe som også er vanlig å se ved infeksjoner (5). Det ble observert en ringformet struktur med et tykt cellelag rundt, noe som kunne minne om en blodåre. Dette kan tyde på at sarkomet har dannet egne blodtilførsels ganger som forsyner det med blod, og kan dermed være en forklaring på hvorfor sarkomet fortsetter å vokse. I A₃ (**bilde 2, midten**) var det mulig å observere et tydelig skille mellom normalt, strukturert bindevev, som opptrer i bølger, og mer lineært og ustrukturert bindevev. Her kunne man igjen observere en struktur som minner om en arterie. I A₄ (**bilde 2, høyre**) var bindevevet svært ustrukturert sammenliknet med de to andre snittene. Cellebildet her var ellers dominert av celler med økt N/C-ratio, samt områder med sirkulære, åpne hulrom. Disse hulrommene kan sees i mange av snittene fra B- og C-blokkene og er av ukjent opphav. Her ble det igjen observert en celle som liknet på en makrofag.

På grunn av det dominerende bindevevet var det vanskelig å få et tydelig cellebilde. Det ble derfor også farget et A₂-snitt med HE for å sammenlikne cellebildet (**bilde 3, nederst**). I snittet farget med HE kom cellene mye tydeligere frem. Her var det mulig å observere en stor andel nakne, forstørrede cellekjerner, i tillegg til cellene med økt N/C-ratio, samt noen mindre, nakne cellekjerner. Ulempen med å farge med HE kontra HES er at bindevevet ikke vises ved HE-farging. Siden A-blokkene var dominert av bindevev, var dette svært viktig å få frem.

5.2.2 B-snittene

De ti B-blokkene ble tatt i fra ytterste del av primærsvulsten, og ble hentet like etter oppstart av behandling i februar 2024. Ettersom B-blokkene befant seg i ytterste del av primærsvulsten var de mer utsatt for skjæring og behandling av blokkene, da steroidekremen som ble benyttet var i direkte kontakt med den ytterste delen av svulsten. Dette kan igjen ha påvirket resultatet ved at både cellegiften og steroidekremen som ble benyttet kan ha påvirket cellebildet i snittene. Det er videre kjent at skjæring av sarkomer kan trigge videre utvikling og vekst av sarkomet, ofte i en mer aggressiv form, noe som kan ha påvirket cellebildet i B-blokkene (3).

Som nevnt var også B-blokkene svært harde, og måtte dekalsineres før de kunne snittes. De ble forsøkt snittet uten dekalsinering, men dette førte til at flere av blokkene sprakk og måtte omstøpes før de kunne dekalsineres og snittes på nytt. Dette gjaldt blokkene B₆, B₇ og B₁₀. Selv etter omstøping og dekalsinering i fem minutter knakk en del av vevsbiten fra B₇ av, men etter ny omstøping ble det oppnådd snitt uten ytterligere dekalsinering. Både B₆ og B₁₀ ble først dekalsinert i fem minutter før snitting, hvor det under snitting knakk av en del i begge blokkene. Det var mistenkt at bitene som knakk av kun var kalsifisert vev som ikke ville være mulig å snitte, og det ble derfor bestemt at blokkene ikke ble omstøpt, men heller dekalsinert i ytterligere tre minutter. Dette gjorde de tilstrekkelig mykt til snitting, og det ble oppnådd snitt.

Alle de resterende blokkene måtte dekalsineres i minimum fem minutter, hvor enkelte blokker måtte dekalsineres i flere omganger. For å vurdere hvor lenge blokkene måtte dekalsineres ble de først dekalsinert i et par minutter, forsøkt beskåret og så videre dekalsinert etter behov. Det var stor forskjell i hvor lenge blokkene måtte dekalsineres, hvor spesielt vevsblokk B₃ skilte seg ut og var så hard at den måtte dekalsineres i 13 minutter (**tabell 9**). I snittet var det mulig å se flere store områder med nekrotisk vev som grenset mot store celleansamlinger bestående av nakne, forstørrede cellekjerner, samt noe acellulært materiale med kraftig gulffarge. Dette materialet liknet på pussansamlinger. Dette skilte seg litt ut fra de resterende B-blokkene, men det er uvisst hvilken betydning cellebildet har for hardheten i blokken.

Det ble oppnådd snitt fra alle B-blokkene, foruten B₉. Snittene måtte skjæres i noe ulik tykkelse, da noen av blokkene var hardere og mer utfordrende å jobbe med, til tross for flere runder med dekalsinering (**tabell 9**). Dette gjaldt B₆ og B₇, hvor disse ble snittet på tre µm, mens de resterende blokkene ble snittet på to µm. Det ble forsøkt å snitte B₉ på fem µm, men selv ved denne tykkelsen var det utfordrende å få snitt, hvor snittet også falt av under farging. Tykkelsen på snitt kan være en faktor som påvirker hvor godt snittet fester seg til objektglasset, samt fargerresultatet, ved å gjøre fargene sterkere. I dette tilfellet hadde ikke snittene fra B₆ og B₇ noen kraftigere farger sammenlignet med de andre snittene fra B-blokkene, og snittene ble besluttet å være tilstrekkelige til bruk.

Felles for B-blokkene var at de inneholdt store, nekrotiske områder, men hvor mengden celler tilstede varierte. I snittene fra B₁₋₄, B₆, B₈ og B₁₀ var det flere store ansamlinger av forstørrede, nakne cellekjerner (**bilde 4-7, 9-10**). Også i snitt fra B₇ var det mulig å se noen spredte, nakne og forstørrede cellekjerner, men ikke i like store ansamlinger som i de resterende blokkene (**bilde 8**). I snitt fra B₅ var det nekrotiske områder med enda færre celler, sammenlignet med de øvrige blokkene (**bilde 6**). I snitt fra blokkene B₁, B₄ og B₇ var det mulig å se store områder med nekrotisk vev med spredte, forstørrede, nakne cellekjerner (**bilde 4, 6, 8**). I motsetning ble det i snitt fra B₂ og B₃ observert at det nekrotiske området hadde mer ansamlinger med forstørrede, nakne cellekjerner (**bilde 5**). Det ble observert noen få slike ansamlinger i snitt fra B₈ og B₁₀, hvor de hadde en stripe av forstørrede, nakne cellekjerner som lå ett inntil hverandre, i tillegg til områder med mer spredte cellekjerner

(**bilde 9-10**). Cellene som lå i ansamlinger kan likne på immunceller, hvor disse kan ha dukket opp som en reaksjon på betennelse og infeksjon i vevet (5). I snittet fra B₅ ble det observert nekrotisk vev med ustrukturert bindevev som var relativt cellefattig, samt områder med tydelige overganger mellom nekrotisk, cellefattig vev og vev som holdt på å bli nekrotisk (**bilde 6**). Slike overgangssoner ble også observert i B₁ og B₃, men her var overgangssonen fra det nekrotiske vevet til et mer cellerikt vev med flere nakne, forstørrede cellekjerner, i motsetning til B₅ (**bilde 4-5**). Nekrotiske områder er typiske å se ved virusinfeksjoner, da den glatte muskulaturen i tunica muscularis blir byttet ut med nekrotisk vev. Dette kan forklare den høye forekomsten av nekrose i noen av B-blokkene (5).

I snittene fra B₁₋₂, og B₄₋₆ forandret cellebildet seg til å inneholde flere områder vev som holdt på å bli nekrotisk med mange spredte, nakne cellekjerner, og vev som allerede var nekrotisk og rikt på bindevev (**bilde 4-7**). Bindevevet var lineært, ustrukturert og cellefattig, noe som er typisk å se ved langvarige infeksjoner og arrdannelser (17). I B₄ var det mulig å se flere avlange strukturer, som ble antatt å være blodårer, og som var omkranset av bindevev (**bilde 6**). For å få til en vekst er celler avhengig av en jevn tilførsel av næringsstoffer, hvor blodårene kan ha bidratt med å forsyne tumorcellene med dette, og dermed bistått i sykdomsbildet. Det var flere snitt som inneholdt slike strukturer, inkludert B₁₋₂ og B₁₀ (**bilde 4-5, 10**). Alle disse snittene viste spor av store, sirkulære strukturer med en tykk ytre cellevegg, noe som er kjennetegnet på den histologiske formen til en blodåre.

I snittet fra B₃ ble det observert en unik struktur i form av flere cellelag som lå flatklemt oppå hverandre, hvor flere av de nederste cellene hadde mistet cellekjernen sin (**bilde 5**). Cellene hadde også et rosa-rødlig omriss. De få nederste cellene som hadde cellekjerner hadde en flatere cellekjerne og avlangt cytoplasma, hvor det kan se ut som cellene holdt på å bli keratiniserte. Dette ble ikke observert i de resterende B-blokkene, og betydningen for denne strukturen på tumor-veksten er ukjent. Et kjennetegn til sarkom er hyperkeratose og tilstedeværelse av keratinocytter. Dette kan forklare cellene som holdt på å bli keratinisert. Cellene ble derimot ikke studert noe nærmere, og man kan dermed ikke fastslå at dette var keratinocytter (4). Fra annen litteratur er det kjent at epidermis har et tynt lag av keratiniserte celler, men ettersom orienteringen av de ulike vevsblokkene var ukjent er det ikke mulig å

konkludere med om dette var epidermis og celler som holdt på å bli keratiniserte, eller om det var en annen struktur.

I snittene fra B₁ og B₆ ble det observert tydelige tumorutvekster, hvor det i B₁ ble observert én tumorutvekst, mens det ble observert to tumorutvekster i samme område i B₆ (**bilde 4 og 7**). Slike tumorutvekster var forventet å finne mikroskopisk, med tanke på hvor stort sarkomet var. Felles for alle de tre tumorutvekstene var at de inneholdt ansamlinger forstørrede, nakne og spredte cellekjerner, hvor tumorutveksten i B₆ også så ut til å inneholde vev som holdt på å bli nekrotisk. Hyperplasi og nekrose er et histologiske kjennetegn ved BPV-infeksjon og annen virusinfeksjon, og er derfor forventet å finne her (4). Tumorutvekstene så ut til å vokse ut fra vevet med noe tydelige avgrensninger til vevet under. Disse utvekstene befant seg i ytre del av vevet på det som kan minne om epidermis, men det er vanskelig å konkludere uten å vite nøyaktig orientering på vevsblokkene og hvor de er hentet fra.

Det ble observert acellulært material, som kunne minne om pussansamlinger i de fleste vevsblokkene. Pussansamlingene inneholdt flere mørke korn, hvor noen av disse ble antatt å være rester etter døde celler. Pussansamlingene befant seg i typisk nekrotiske, cellefattige områder, hvor det i B₈ og B₁₀ også ble observert puss som hadde en skarp magentarosa farge. Det er usikkert om dette kan ha kommet av at visse deler av vevet har tatt til seg ekstra mye farge, eller om det er en annen patogen eller normal årsak. Pussansamlinger kan oppstå som følge av infeksjoner eller betennelser, hvor det er uvisst om svulsten er årsaken til de mange pussansamlingene, eller om det kan ha vært et patogen eller en sekundær-infeksjon som har ført til disse. I blokkene B₇₋₈ og B₁₀ ble det observert noen strukturer som liknet på spindelvev. Disse “spindelvev”-formede strukturene likner på de strukturene som man finner hos adipocytter og i øvre del av adventitia serosa. Det var ikke mulig å konkludere hva disse strukturene var uten videre arbeid, men ettersom alle disse strukturene befant seg i områder med nekrotisk vev kan det spekuleres i om de har en korrelasjon med patogen vev.

Felles for B-blokkene var at de inneholdt mange ulike strukturer. B₁₋₆ besto av områder som var nekrotiske og cellefattige, områder som var cellerike og områder med mye eller lite bindevev. B₇₋₁₀ besto hovedsakelig av områder som var nekrotiske og mindre cellerike, samt

mindre bindevev tilstede. Det cellefattige bildet som sees i mange av B-snittene kan forklares med at steroidekremen som ble benyttet i behandlingen var i kontakt med den ytterste delen av svulsten som B-blokkene var hentet fra. Som vist i **bilde 1** kan man se at dette gjelder blokker som B₁₋₆, som forklarer det blandede cellebildet til blokkene. Steroidekremen kan da ha drept friske celler i vevet, i tillegg til de virusinfiserte cellene. B-blokkene med høyere nummerering (B₇₋₁₀) befant seg lengre inn mot midten av svulsten og var dermed mer beskyttet mot både steroidekremen og skjæring. I snittene fra B₁₋₆ ble det observert mer cellerike områder med ansamlinger av celler, hvor hyperplasi er ett av kjennetegnene ved BPV-infeksjon (4). Cellebildet til B₇₋₁₀ var dominert av nekrotisk vev. Dette kan skyldes at sarkomet har vokst, vevet blir da trykt sammen og komprimert, noe som fører til at vevet til slutt blir nekrotisk.

Et annet fellestrekk for flere av B-blokkene var små, hvite og sirkulære «hull», hvor disse var spesielt synlig i snittene fra B₁₋₂ og B₅ (**bilde 4-6**). Det er ukjent nøyaktig hva disse strukturene er, om de er vanlige hos hest eller om de indikerer tegn på sykdom. Hullene kan også ha oppstått under behandling av vevet, men ettersom hullene er så like i form og størrelse i de ulike snittene ble det antatt at det var mer sannsynlig at disse enten er av histologisk struktur som er vanlig hos hest, eller at de har oppstått som følge av BPV-infeksjon. I tillegg til de sirkulære hullene hadde mange av snittene lange, hvite «striper». Dette kan skyldes at vevet ble strukket i vannbadet, men kan også oppstå naturlig i overgang mellom to typer vev, hvor det ene vevet fortsatt er levende og det andre er dødt. Når cellene kombineres som følge av dette kan det oppstå slike «striper». I flere av snittene var det mulig å se ulike fargenyanser av rosa og lilla, hvor det var usikkert hvorvidt disse var reelle fargenyanser eller fargenedslag i snittet som følge av den forsiktige behandlingen av det.

5.2.3 C-snittene

De ti C-blokkene ble tatt fra den innerste delen av primærsvulsten i februar 2024, altså på innsiden av området B-blokkene ble hentet fra. Rotfestet til sarkomet befant seg i indre del av området der C-blokkene ble hentet fra, og kan dermed inneholde noe normalt vev fra hesten. Ettersom blokkene er hentet fra indre del var de også mer beskyttet mot skjæring og steroidekrem, da denne ikke kom i direkte kontakt med vevet. Det ble derimot benyttet

cellegift, som vil ha vært i kontakt med vevet. Dette kan ha påvirket resultatet og cellebildet som ble observert.

Prøvematerialet ble makrobeskjært i ti blokker, kalt C₁-C₁₀, hvor også disse måtte dekalsineres grunnet hardheten i vevet. Alle blokkene ble først dekalsinert i fem minutter, og deretter forsøkt snittet. De fleste var tilstrekkelig dekalsinert etter fem til syv minutter (**tabell 10**). Ved snitting av C₅ løsnet vevet fra blokken som følge av ugunstig innstøping, noe som førte til at det havnet at luftbobler mellom parafinen og vevsbiten. Alle vevsblokkene, foruten C₈, var tilstrekkelig myke til å bli snittet på to µm. Selv etter dekalsinering var det utfordrende å snitte C₈, noe som resulterte i at det ble snittet på tre µm. Dette kan ha ført til noen fargeforskjeller mellom snittene, da tykkelsen på snittet kan være med på å påvirke fargerresultatet og gi en sterkere farge med tykkere snitt. Alle C-blokkene ble farget med HES, men grunnet skjørheten til vevet måtte det behandles skånsomt under avparafineringen, rehydreringen, fargingen og dehydreringen. Dette kan forklare noe av fargenedslagene som ble observert i flere av snittene. Til tross for dette var kvaliteten på fargene fine, og det ble vurdert at snittene kunne benyttes.

Det ble observert flere fellestrekk for de ulike blokkene. Blant disse var hvite striper med åpne hulrom i flere deler av vevet. Stripene kan komme av at vevet var svært porøst og skjørt, og ble dermed strukket i vannbadet etter snitting. Disse kommenteres ikke ytterligere, da det ikke anses at de har noen patologisk signifikans. Videre ble det funnet artefakter i form av vanndråper i snittene fra C₁ og C₂, samt fargenedslag i snittene fra C₁, C₄, C₆ og C₁₀ (**bilde 11-13, 17 og 20**). Det ble også observert strukturer som kunne minne om blodårer i alle blokkene. Dette kan tyde på at sarkomet har dannet seg egne blodtilførsels ganger som forsyner det med de nødvendige næringsstoffene, og en forklaring på hvorfor det fortsetter å vokse.

Felles for snittene var at vevsblokkene inneholdt områder med flere ulike cellebilder, hvor noen områder var nekrotiske og cellefattige, mens andre var mer cellerike med nakne, forstørre cellekjerner og celler med økt N/C-ratio. I andre områder var det mulig å se tydelig muskulatur hvor noe var sterkt farget rosa og viste tegn på nekrose, samt områder med

bindevev som var både lineært og ustrukturert, og bølgete, strukturert bindevev. I de samme snittene kunne bindevevet være både cellerikt og cellefattig, avhengig av hvor man befant seg i snittet. Ved infeksjon er det vanlig at den glatte muskulaturen i tunica muscularis blir erstattet av nekrotisk vev (5). Dette kan forklare den høye forekomsten av nekrotiske områder i C-blokkene. De nekrotiske områdene var så fremtredende at man kunne se et tydelig skille mellom nekrotisk og cellerikt vev, samt nekrotisk vev og vev som holdt på å bli nekrotisk i mange av blokkene. Et histopatologisk kjennetegn ved BPV-infeksjon er hyperplasi, hvor dette var observert i flere av C-blokkene (4). Ved virusinfeksjoner er det også forventet å finne immunceller i vevet. I snittene var det flere store celleansamlinger med nakne, forstørrede cellekjerner, hvor noen av disse kan være immunceller (5).

Det at det ble observert områder med tydelig muskulatur, samt områder med både strukturert og ustrukturert bindevev, viser hvor forskjellig vevet er avhengig av hvor det ble tatt fra. C-blokkene inneholdt vev som hadde litt mer «normal» struktur, slik som strukturert og bølgete bindevev, samt muskulatur, og disse områdene kan ha blitt tatt fra et område inn mot hesten hvor sarkomet enda ikke hadde spredt seg. Det ustrukturerte bindevevet som ble observert kan være forårsaket av arrdannelse, noe som kan ha oppstått ved langvarige infeksjoner. Dette kan ha skjedd mens sarkomet vokste, noe som førte til at vevet ble trykt sammen, før sarkomet fortsatte å vokse. I tillegg til dette ble det observert store gulfargede strukturer av acellulært materiale, som antas å være pussansamlinger i flere av blokkene. Puss tyder på inflammasjon i vevet, og kan komme som følge av betennelser eller infeksjoner. I blokk C₅ og C₈ (**bilde 15 og 18**) ble det observert strukturer som kunne minne om papillae-formasjoner, hvor dette er et mikroskopisk kjennetegn ved sarkomer (4). Dette var vanskelig å bedømme da det opptrer i epidermis, og det ikke kunne kartlegges hva som var epidermis og hva som var dermis. I et område på C₅ som holdt på å bli nekrotisk ble det observert et fremmedlegeme av ukjent opprinnelse (**bilde 16**). På 40X-objektet kom det tydeligere frem at fremmedlegemet delte mange av kjennetegnene med en amøbe. Dersom dette er en amøbe kan dette forklare noen av de store pussansamlingene som ble observert i snittet. Det kan også være en separat sekundær-infeksjon i vevet som kan forklare fremmedlegemet.

C₉ skilte seg noe ut fra de andre blokkene. Her ble det observert flere cellerike områder, og svært få områder som var nekrotiske. Cellebildet var dominert av cellerike områder med både

forstørrede, nakne cellekjerner og celler med økt N/C-ratio. Bakgrunnen hadde en sterk gulfarge (**bilde 19**). Gulfargen var sterkere enn det som observeres ved bindevev og det acellulære materialet, og det er ukjent hva den skyldes. Dette tilsier at det er noe annet i snittet som tar til seg safran-fargen. I de cellerike områdene ble det også observert noen vakuoler. Øverst i snittet i området som mistenkes å være epidermis, ble det observert noe som kunne minne om en utvekst (**bilde 19**). Denne utveksten bestod av mange nakne celler med forstørrede cellekjerner. Dette var ikke uforventet å finne mikroskopisk, da sarkomet var svært stort makroskopisk med flere ulike utvekster. Nederst i det samme snittet ble det observert et område bestående av flere lag med flatklemte celler med et rødt omriss, noe som også ble observert i snittet fra B₃. Noen av cellene hadde økt N/C-ratio, mens andre hadde mistet cellekjernen sin. Jo nærmere de kom kanten av vevet, jo flatere ble de. Disse cellene likner på celler som holder på å bli keratinisert. Det kunne se ut som de befant seg i epidermis, men dette var ikke mulig å konkludere grunnet manglende informasjon om vevets orientering ved innsamling og støping. Et kjennetegn ved fibroblastiske sarkom er hyperkeratose og tilstedeværelse av keratinocytter i vevet (4). Dette ble derimot ikke funnet i noen av C-blokkene, og cellene kunne heller ikke defineres som keratinocytter, da det ikke ble gjort noe viderearbeid.

5.3 Histopatologiske utfordringer

Generelt var vevsblokkene svært harde og vanskelige å skjære, hvor de måtte gjennom flere runder med dekalsinering før det ble oppnådd snitt med ønsket tykkelse. Unntaket var A-blokkene som var mulig å skjære uten dekalsinering. Disse var også hentet fra et annet område enn B- og C-blokkene, hvor A-blokkene kom fra en liten sekundærsvulst i nærheten av primærsvulsten, hvor B- og C-blokkene var hentet fra. Hardheten i B- og C-blokkene kan mulig gjenspeile grad av kalsinering, da spesielt B-blokkene måtte dekalsineres lenge før de kunne snittes.

A-snittene var en del mykere, og det ble oppnådd flest snitt av disse, hvor de kunne farges med både HE og HES. For de andre B- og C-blokkene var det utfordrende å få samlet inn like mange snitt, og det ble besluttet å fokusere på HES-farging for å få et bedre helhetsinntrykk av vevet. Under HES-farging av snittene ble det observert at en del av vevssnittene ikke var festet tilstrekkelig til objektglassene, og det var flere som falt av under farging. Dette gjaldt

spesielt snitt fra B- og C-blokkene. Dette resulterte i at snittene måtte behandles svært varsomt under avparafinisering, rehydrering, farging og dehydrering for å hindre at de falt av objektglassene. Snittene ble dermed ikke ristet spesielt hardt under de ulike trinnene, noe som førte til en del artefakter i form av fargenedslag og vandrdåper (kan blant annet sees i C₄). For å få et best mulig fargerresultat er det viktig at snittene både avparafiniseres, rehydreres og dehydreres tilstrekkelig, noe som krever at snittene kan ristes. Da de måtte behandles så varsomt ble det mest sannsynlig noe vann igjen i snittet, noe som påvirket fargingen. Til tross for dette var selve fargene fine, hvor strukturene hadde ønsket farge og kom tydelig fram i snittene. Det ble derfor besluttet at snittene kunne benyttes.

Til tross for at snittene ble behandlet varsomt var det flere av snittene som hadde deler som løsnet av objektglasset under fargingen, noe som ble sett under mikroskopet. Dette gjaldt blant annet for snitt som B₃ og C₆ (**bilde 5 C-D**, og **bilde 17 B**). For snitt C₇ og B₉ ble det forsøkt farget snitt med større tykkelse, men under inkubering i varmeskapet ville ikke snittene feste seg til objektglassene, hvor store deler av vevet falt av under farging. I tillegg til å falle av objektglasset la vevsbitene seg over hverandre i en brett, noe som gjorde det utfordrende å se strukturene under bretten. Makroskopisk var B₉ svært mørk i fargen og hard, hvor det kan antas at blokken var svært kalsinert. Dette resulterte i at det ikke var mulig å mikroskopere snittene, og blokkene B₉ og C₇ måtte arkiveres. Det ble observert flere slike bretter i en del av snittene fra B- og C-blokkene, noe som kunne observeres som svært mørkelilla områder med skarpe grenser. Noen av disse kunne mistolkes som grenser mellom nekrotisk og cellerikt vev, og skyldes at snittet ikke festet seg tilstrekkelig til objektglasset og løsnet under farging. For å forebygge dette i senere arbeid kunne det vært forsøkt å benytte objektglass med bedre feste, som pluss glass eller immunglass. Disse glassene er coatet på en annen måte, og kan derfor gjøre at vevet fester seg bedre. Dette Med bedre feste kunne dette også ført til at snittene hadde tålt en hardere behandling og risting under fargingen, noe som kunne forebygget fargeartefakter og ført til mer optimale fargede snitt.

5.3 Molekylære påvisningsmetoder for BPV-virus

5.3.1 RT-LAMP

Flere studier har vist at det er BPV innenfor *Deltapapillomavirus* som bidrar til utvikling av sarkomer, og at hester som utvikler sarkomer vanligvis er infisert med BPV-1, -2 eller BPV-13, hvor infeksjon med BPV-1 eller BPV-2 er vanligst sammen med sarkom-utvikling (9). Det ble derfor besluttet å teste for tilstedeværelsen av disse virustypene gjennom RT-LAMP. Begge kontrollene om ble benyttet for hvert av virus-påvisningene var negative, noe som utelukker at det var forurensning i prøvene, og det ble besluttet at resultatene kunne benyttes. Ved testing ble resultatene for RT-LAMP entydig negative for BPV-1 og BPV-13, mens resultatene for BPV-2 var inkonklusive, til tross for gjentatte analyser. Dette kan ha flere forklaringer, og kan skyldes de naturlige egenskapene til sarkomet og utfordringene knyttet til det å jobbe med slikt vev.

For å kunne ekstrahere DNA måtte vevet beskjæres i mindre biter og lyses, hvor det er anbefalt å mose vevet til små biter for best ekstraksjon og utbytte av DNA (Qiagen, Germany). Bitene fra de ulike blokkene ble forsøkt most, men grunnet hardheten i vevet var det utfordrende å få vevet i små nok biter. Dette gjaldt spesielt bitene som ble hentet fra samme område i sarkomet som B- og C-blokkene. Denne delen av sarkomet var mye mørkere i fargen, svært hardt og mye tyngre, sammenliknet med vevet som ble hentet fra samme område som A-blokkene. Vevet fra A-blokkene var godt merket i egne kassetter, mens resterende del av sarkomet hvor B- og C-blokkene var hentet fra var ikke merket, og det var ikke mulig å skille mellom hva som ble hentet fra henholdsvis B- og C-delen av sarkomet. Ved veiing av bitene var det utfordrende å beskjære nøyaktig mengde som anbefalt (20 mg), og noen av bitene hadde litt ulik størrelse (**tabell 5**). Dette kan ha påvirket lyseringen og lyseringstiden av vevet, samt hvor mye DNA som ble ekstrahert fra de ulike bitene, og dermed det inkonklusive resultatet for BPV-2.

Vanligvis er det anbefalt å ha prøvene i varmeskap over natten for lysing av vevet, men grunnet hardheten i vevet fra B- og C-området ble det bestemt å ha vevet i varmeskap i 18 timer. Selv etter 18 timer var ikke vevet fra disse områdene fullstendig oppløst eller lysert, noe som kan spekuleres til og skyldes hardheten i vevet og den store mengden kalsifisering.

Det at vevet ikke ble fullstendig lysert kan videre ha påvirket mengden DNA som ble ekstrahert fra vevet, noe som igjen kan ha påvirket resultatene av RT-LAMP (Qiagen, Germany). Under snitting av vevsblokkene ble det merket at vevsblokkene fra B var spesielt harde og kalsifisert, mens vevsblokkene fra C var noe mindre kalsifisert. Mengden kalsifisering kan spekuleres til å ha påvirket hvor godt vevet ble lysert, og om DNA kunne ekstraheres eller ikke. Dersom vevet hadde vært bedre merket kunne det vært forsøkt å velge vev fra C-blokken, og sett om dette kunne ført til mer entydige resultater. Vev fra A-blokkene ble lysert i større grad enn de resterende områdene, men resultatene fra disse var også inkonklusive.

Sarkomet som ble utdelt hadde blitt fiksert i formalin, hvor det hadde ligget i flere måneder. Vevet fra A-blokkene ble hentet ut og lagt i formalin i oktober -23, mens vevet fra B- og C-blokkene ble hentet ut i februar -24 og lagt i formalin. Forberedelsene og gjennomføringen av RT-LAMP ble ikke gjennomført før 9-10.04, noe som vil si at vevet hadde ligget i formalin i henholdsvis seks og to måneder. For best ekstraksjon av DNA er det anbefalt å bruke ferskt eller frosset vev, noe som vil gi et bedre resultat, i henhold til prosedyre for formalinfiksert vev fra produsenten Qiagen «DNeasy Blood & Tissue» (Qiagen, Germany). Det finnes flere som har sett på bruken av RT-LAMP til påvisning av andre virus hos kyr, hvor de har sett at det har vært en sensitiv og god påvisningsmetode (19, 20). Disse studiene har derimot brukt ferskt vev fremfor formalinfiksert vev. Det finnes lite tilgjengelig litteratur som har sett på det å benytte RT-LAMP for påvisning av BPV i formalinfiksert vev fra hest, men en studie fra Luo et al viste at det var mulig å få tre ganger større utbytte fra formalin-parafin-fiksert vev ved å optimalisere inkubasjonstiden, inkubasjonstemperaturen og konsentrasjonen av løsningen som benyttes for å reversere kryss-bindingene fra formalin, hvor metoden kalles HiTe (21). Dette kunne vært forsøkt gjort for å se om det kunne ført til et bedre utbytte av DNA, da vevet hadde ligget svært lenge i formalin og kan være preget av dette, hvor en slik metode kunne bidratt til større utbytte av DNA, noe som igjen kunne ført til et tydeligere resultat i RT-LAMP. Videre kan primerne som har vært benyttet vært for dårlige, at DNA var for degradert etter å ha ligget så lenge i formalin, eller noe annet i vevet som inhiberer signalet og påvirker smeltekurven.

6 Konklusjon

I vevsblokkene fra sarkomet ble det funnet mange histologiske forandringer som likner de man finner ved infeksjoner, hvor spesielt vev fra B-blokken var nekrotisk. Det var mulig å observere indikasjoner på at behandlingen som ble utført hadde en effekt på den histopatologiske sammensetningen i vevet, da strukturene som ble observert i B- og C-blokkene skilte seg ut fra strukturen i A-blokkene. Samtidig viste C-blokkene et annerledes cellebilde enn B-blokkene, hvor det ble observert større grad av nekrose og celleansamlinger med store, nakne cellekjerner.

Det er utfordrende å trekke noen konklusjoner, da det finnes svært lite kunnskapsgrunnlag tilgjengelig om equine sarkom og den histopatologiske karakteriseringen og forandringene som oppstår ved BPV-infeksjon. Før det kan trekkes konklusjoner trengs det flere studier som ser på kartlegging av BPV-infeksjon og hvordan en slik infeksjon påvirker det histopatologiske bildet. Ved viderearbeid kan det bli aktuelt å benytte objektglass med bedre festeevne for å få optimalt fargede snitt, samt vurdere andre fargemetoder for å få mer informasjon rundt hvilke celler som befinner seg i vevet, og om dette stemmer med de kjente histopatologiske forandringene ved slike infeksjoner.

Equine sarkomer har flere sykdomsårsaker, hvor BPV-infeksjon er én av disse. Resultatene fra RT-LAMP var entydig negative for BPV-1 og -13, og inkonklusiv for BPV-2. Dette kan tyde på at det er noe i vevet som blir amplifisert, men at det er noe annet i vevet som inhiberer amplifiseringen. Det finnes lite tilgjengelig litteratur på bruken av RT-LAMP som påvisningsmetode for BPV-infeksjon, og det anbefales å jobbe videre med metodikken for å kartlegge om denne kan benyttes.

7 Litteraturliste

1. Munday JS. Bovine and Human Papillomaviruses: A Comparative Review. *Veterinary Pathology*. 2014;51(6):1063-75.
2. Nasir L, Brandt S. Papillomavirus associated diseases of the horse. *Vet Microbiol*. 2013;167(1-2):159-67.
3. Fjordbakk CT. De tre vanligste hudsvulstene hos hest. *Norsk veterinærtidsskrift*. 2024;74-81.
4. Beatrice F, Paola R. Equine Sarcoid. In: Catrin R, Albert R, editors. *Equine Science*. Rijeka: IntechOpen; 2020. p. Ch. 7.
5. Holz CL, Sledge DG, Kiupel M, Nelli RK, Goehring LS, Soboll Hussey G. Histopathologic Findings Following Experimental Equine Herpesvirus 1 Infection of Horses. *Front Vet Sci*. 2019;6:59.
6. Horobin R. Theory of histological staining. *Bancroft's Theory and practice of histological techniques*. eighth ed. Scotland: Elsevier Limited; 2019.
7. Bancroft J, Layton C. The hematoxylin and eosin. *Bancroft's Theory and practice of histological techniques*. eighth ed. Scotland: Elsevier Limited; 2019.
8. de Carvalho RF, Araldi R, de Lima TN, Modolo D, de Souza JM, Beçak W, de Cassia Stocco R. Synergic associations between the bovine papillomavirus infection and alimentary cofactors. 2016.
9. Roperto S, Russo V, Leonardi L, Martano M, Corrado F, Riccardi MG, Roperto F. Bovine Papillomavirus Type 13 Expression in the Urothelial Bladder Tumours of Cattle. *Transbound Emerg Dis*. 2016;63(6):628-34.
10. Ragland WL, Keown GH, Gorham JR. An Epizootic of Equine Sarcoid. *Nature*. 1966;210(5043):1399-.
11. Nasir L, Campo MS. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Vet Dermatol*. 2008;19(5):243-54.
12. Yuan ZQ, Gault EA, Gobeil P, Nixon C, Campo MS, Nasir L. Establishment and characterization of equine fibroblast cell lines transformed in vivo and in vitro by BPV-1: model systems for equine sarcoids. *Virology*. 2008;373(2):352-61.
13. Huang WE, Lim B, Hsu C-C, Xiong D, Wu W, Yu Y, et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microbial Biotechnology*. 2020;13(4):950-61.

14. Luo J-g, Ge J-w, Tang L-j, Qiao X-y, Jiang Y-p, Cui W, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of bovine parvovirus. *Journal of Virological Methods*. 2013;191(2):155-61.
15. Choi G, Moehling TJ, Meagher RJ. Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2023;23(1):9-28.
16. Ryding S. What is RT-LAMP Technology? [Internet] Ukjent: News-Medical; 2021 [updated 10.03.24; cited 2024 24.04]. Available from: <https://www.news-medical.net/health/What-is-RT-LAMP-Technology.aspx>.
17. Moyes C, Blessing K. Skin. *Underwood's Pathology - a clinical approach*. Sixth ed. Ukjent: Elsevier Ltd; 2013. p. 614-5.
18. Jokic I, Kalinichenko P. Hud. *Histologi*. 1st ed. Norway: Dalefag AS; 2007. p. 76-7.
19. Xie Z, Fan Q, Liu J, Pang Y, Deng X, Xie Z, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Bovine Rotavirus. *BMC Veterinary Research*. 2012;8(1):133.
20. Luo JG, Ge JW, Tang LJ, Qiao XY, Jiang YP, Cui W, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of bovine parvovirus. *J Virol Methods*. 2013;191(2):155-61.
21. Oba U, Kohashi K, Sangatsuda Y, Oda Y, Sonoda KH, Ohga S, et al. An efficient procedure for the recovery of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Biol Methods Protoc*. 2022;7(1):bpac014.

8 Vedlegg

Vedlegg 1. Vedlegget viser en oversikt over bilder tatt fra vevsblokk A₂-A₄. Bildene i vedlegget har ikke blitt diskutert i bachelor-oppgaven og er kun ment som supplerende innhold.

Vedlegg 2. Vedlegget viser en oversikt over bilder tatt fra vevsblokk B₁-B₁₀, med unntak av B₉. Bildene i vedlegget har ikke blitt diskutert i bachelor-oppgaven og er kun ment som supplerende innhold.

Vedlegg 3. Vedlegget viser en oversikt over bilder tatt fra vevsblokk C₁-C₁₀, med unntak av C₇. Bildene i vedlegget har ikke blitt diskutert i bachelor-oppgaven og er kun ment som supplerende innhold.

Vedlegg 4. Vedlegget viser oppsettet og resultatet for RT-LAMP. RT-LAMP ble utført for BPV-1, -2 og -13.

Vedlegg 5. Vedlegget viser fremgangsmåten for ekstraksjon av DNA fra Qiagen. Fremgangsmåten ble fulgt for å ekstrahere DNA til RT-LAMP.

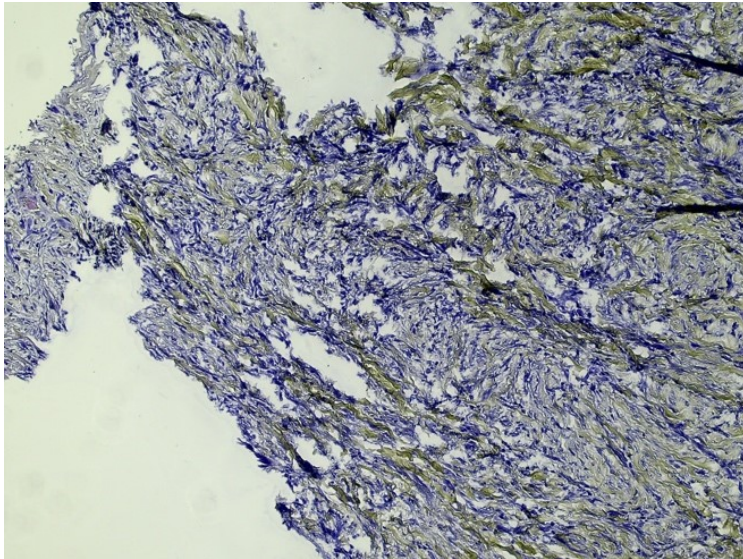
Vedlegg 6. Vedlegget viser risikovurderingen som ble laget i forbindelse med bacheloroppgaven. Risikovurderingen tok hensyn til eventuelle skader som kunne oppstå, konsekvenser av disse og hvordan de kunne forebygges.

Vedlegg 7. Vedlegget viser KI-skjemaet som ble fylt ut. KI-skjemaet er en generklæring på at KI ikke har blitt benyttet i utformingen eller skrivingen av denne bachelor-oppgaven.

Vedlegg 1. Vedlegget viser en oversikt over bilder tatt fra vevsblokk A₂-A₄. Bildene i vedlegget har ikke blitt diskutert i bachelor-oppgaven og er kun ment som supplerende innhold.

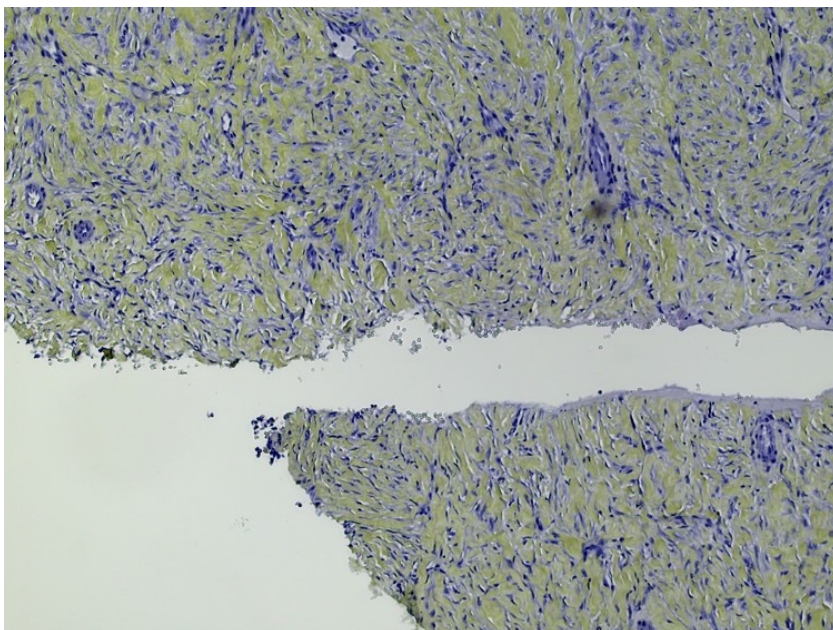
A₂:

Bindevevet i snittet opptrådte som ustrukturert, hvor det ble observert få celler. Bindevevet var noe lineært, og de få cellene som ble observert inneholdt lite cytoplasma og hadde forstørret cellekjerner. Begge bildene er tatt med 10X-objektiv, og er HES-farget.



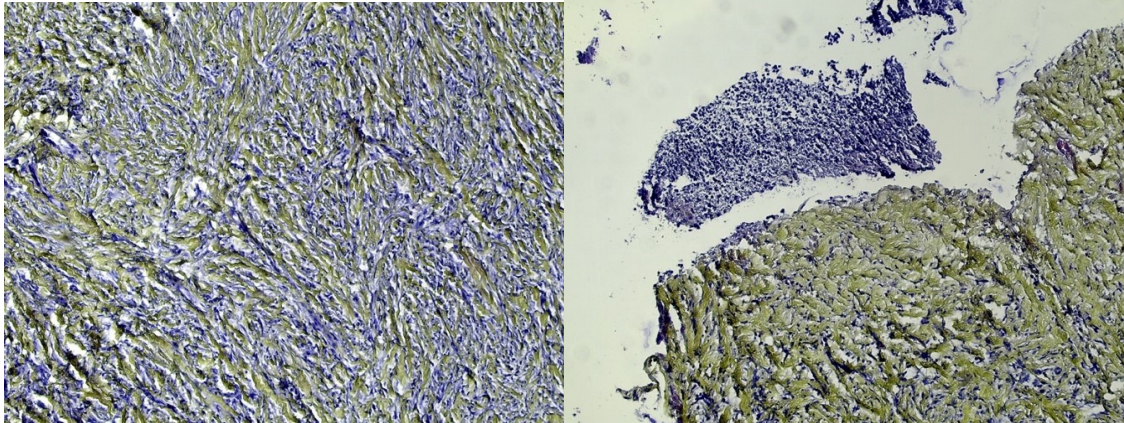
A₃:

Bindevevet som ble observert var en kombinasjon av bølgete bindevev med mer struktur, og bindevev som var mer lineært og ustrukturert. Mellom bindevevet ble det observert spredte celler med store cellekjerner og lite cytoplasma.



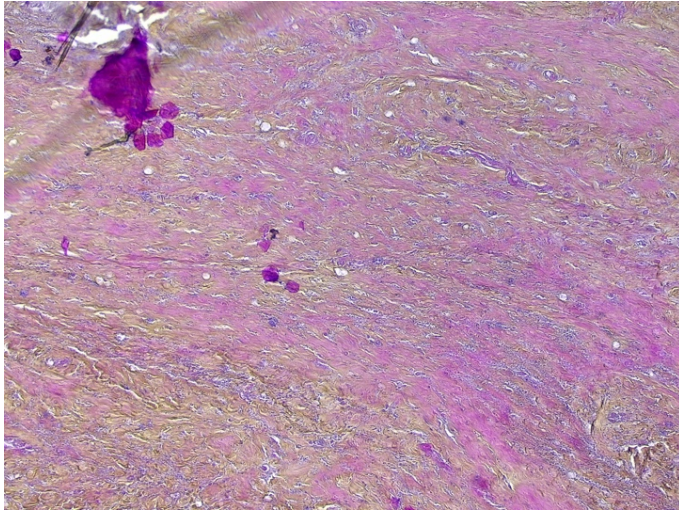
A4:

Det ble observert større grad av ustrukturert bindevev enn i tidligere snitt. I snittet var det også mulig å observere større ansamlinger av nakne cellekjerner, som liknet betennelsesceller. Noen av cellene som ble observert hadde en liten mengde cytoplasma. Bildene er tatt med 10X-objektiv og er HES-farget.



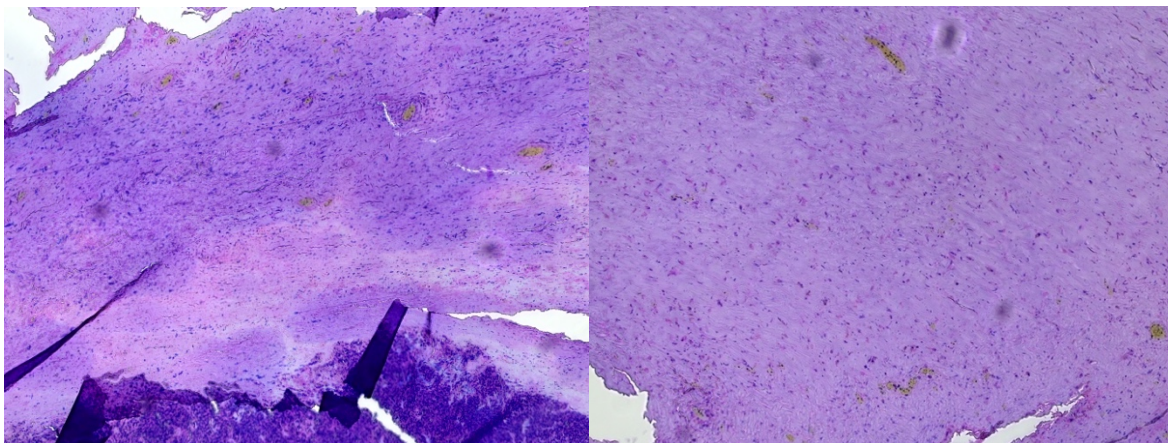
Vedlegg 2. Vedlegget viser en oversikt over bilder tatt fra vevsblokk B₂-B₁₀, med unntak av B₇ og B₉. Bildene i vedlegget har ikke blitt diskutert i bachelor-oppgaven og er kun ment som supplerende innhold.

B₂:

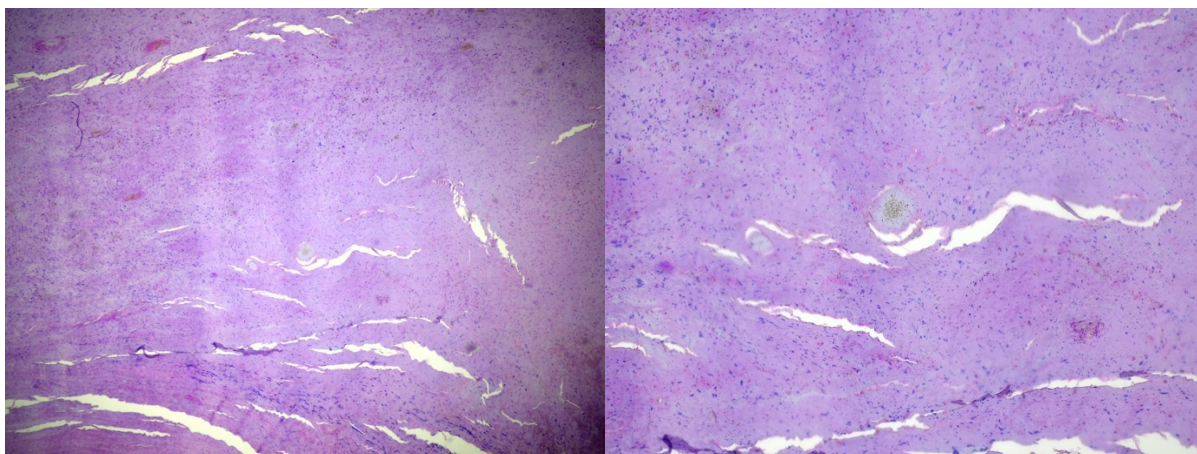


I snittet fra B₂ ble det observert mye nekrotisk vev infiltrert med bindevev, samt få til ingen celler. Snittet inneholdt en del fargenedslag, noe som kan sees øverst til venstre. Bildet er tatt med 10X-objektiv.

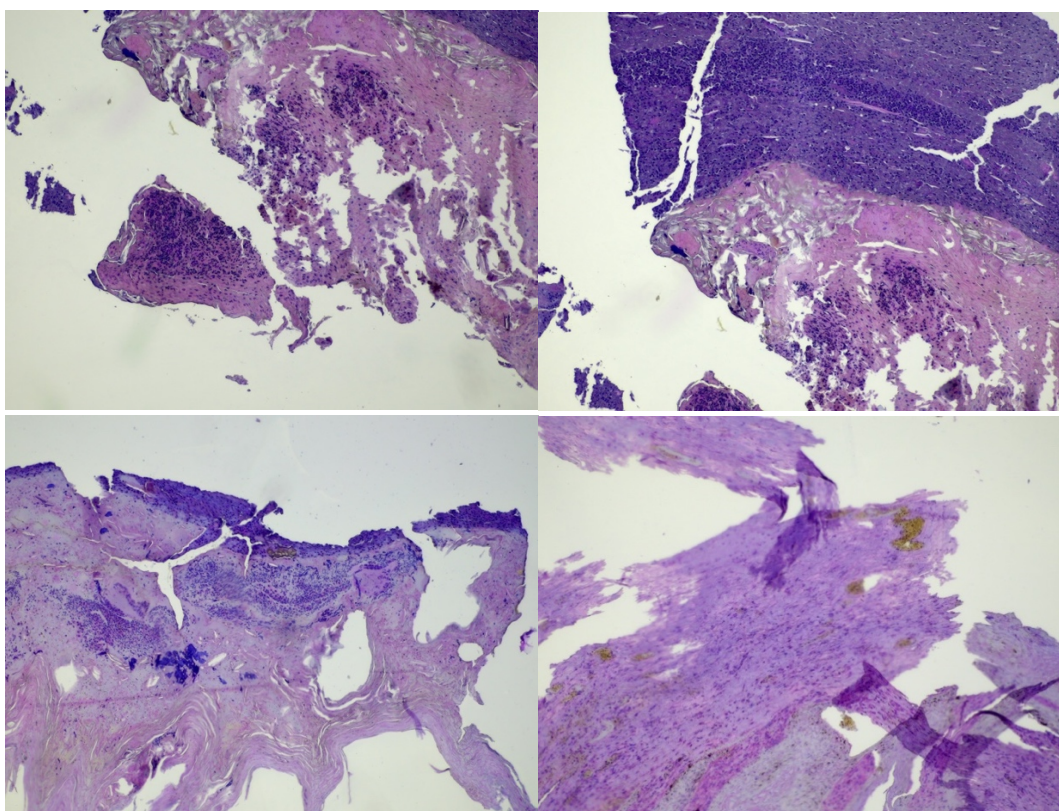
B₃:



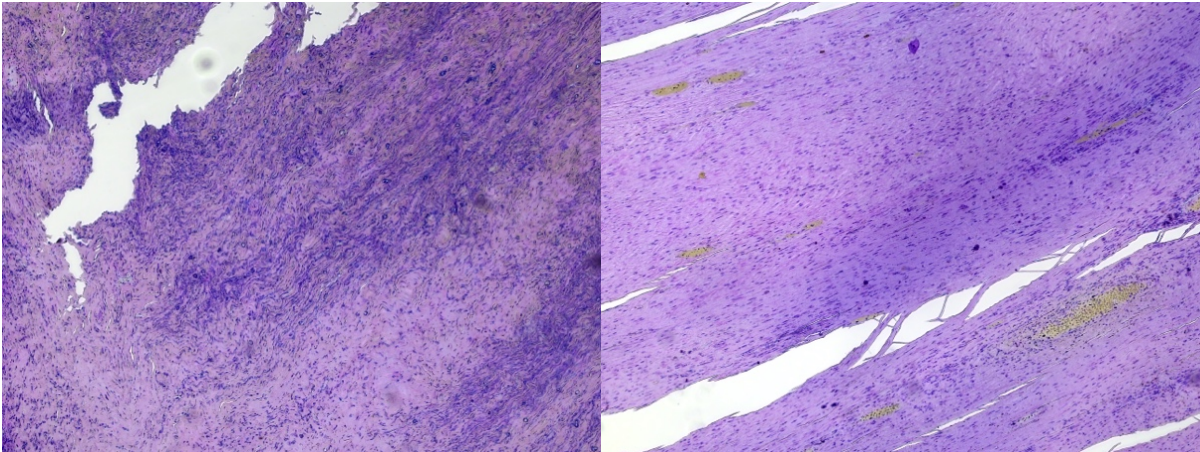
Snittet fra B₃ inneholdt mange, store områder med nekrotisk vev uten bindevev, samt noen ansamlinger av nakne, forstørrede cellekjerner og pussansamlinger. Også her ble det observert noen artefakter, da i form av brett i snittet og vandråper. Begge bildene er tatt med 10X-objektiv.



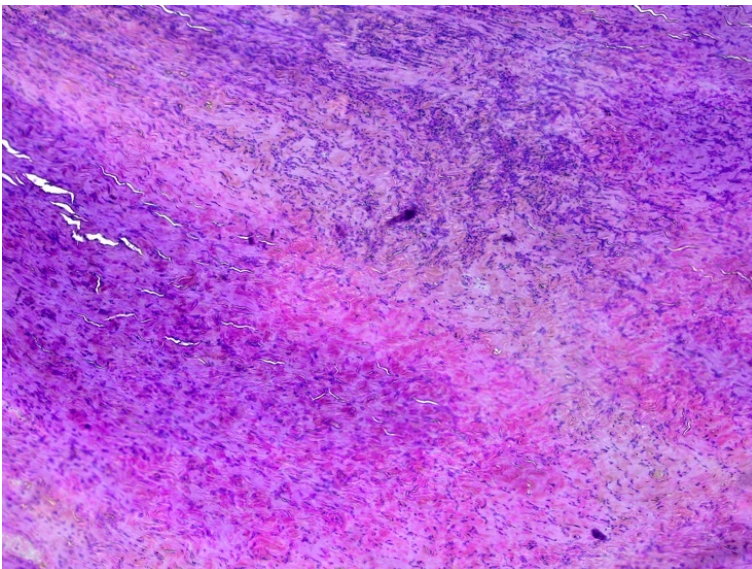
I et annet område av snittet fra B₃ ble det observert et fremmedlegeme på 5X-objektiv (venstre), hvor det ved forstørrelse på 10X-objektiv (høyre) ble observert at den ukjente strukturen hadde en gul kjerne med mørke korn, samt cytoplasma med en grålig farge. Ved forstørrelse på 10X-objektiv ble det konkludert med at fremmedlegemet var for stort til å være en amøbe.



Videre i snittet fra B₃ ble det observert en rekke artefakter i form av hull og brett i vevet, noe som viser hvor skjørt det var å jobbe med under snitting og farging. Det ble observert en rekke nekrotiske områder med lite bindevev, samt enkelte ansamlinger av nakne, forstørrede cellekjerne og pussansamlinger. Vevet viste noen liknende kjennetegn som også sees ved betennelser. Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

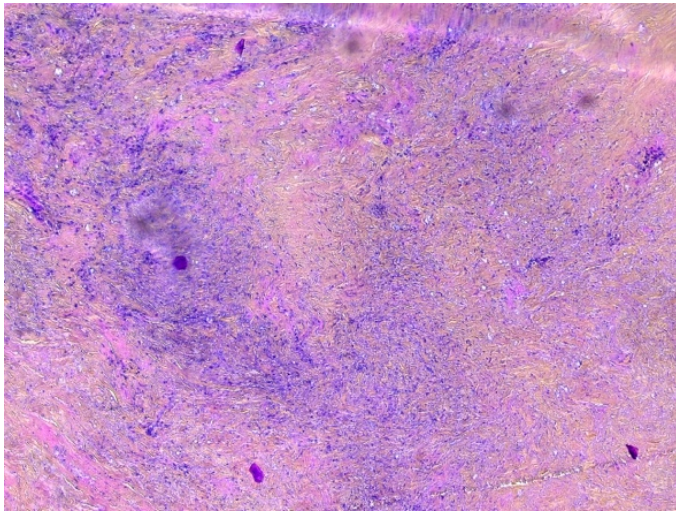
B₄:

I bildene fra snittet til B₄ ble det observert flere cellefattige områder, hvor de få cellene som var tilstede var spredte og uten cytoplasma. Områdene i snittet var generelt nekrotiske, og det ble ikke observert bindevev i disse områdene. I de nekrotiske områdene ble det observert en del gule, ovale strukturer med mørke korn inni, noe som kunne minne om pussansamlinger. Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

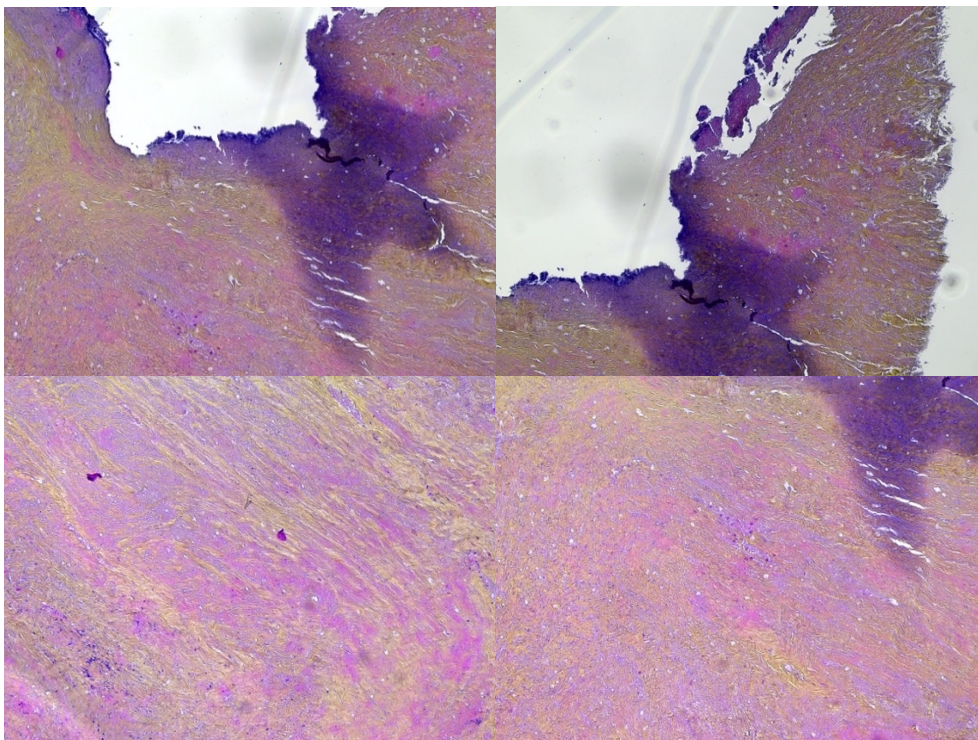
B₅:

I B₅ ble det observert mange nekrotiske områder med få, spredte og forstørrede nakne cellekjerner. De nekrotiske områdene inneholdt svært få mengder bindevev. Bildet er tatt med 10X-objektiv.

B6:

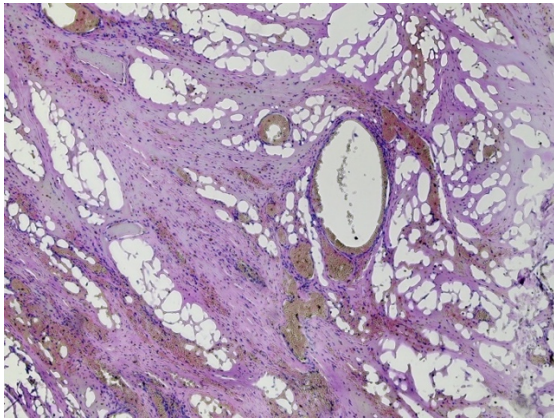


I bildet sees et noe cellerikt, nekrotisk område med spredte, nakne, forstørrede cellekjerner. Området inneholder også en del bindevev. Spredt i bildet kan det observeres noen artefakter i form av fargenedslag og vandrdåper. Bildet er tatt med 10X-objektiv.



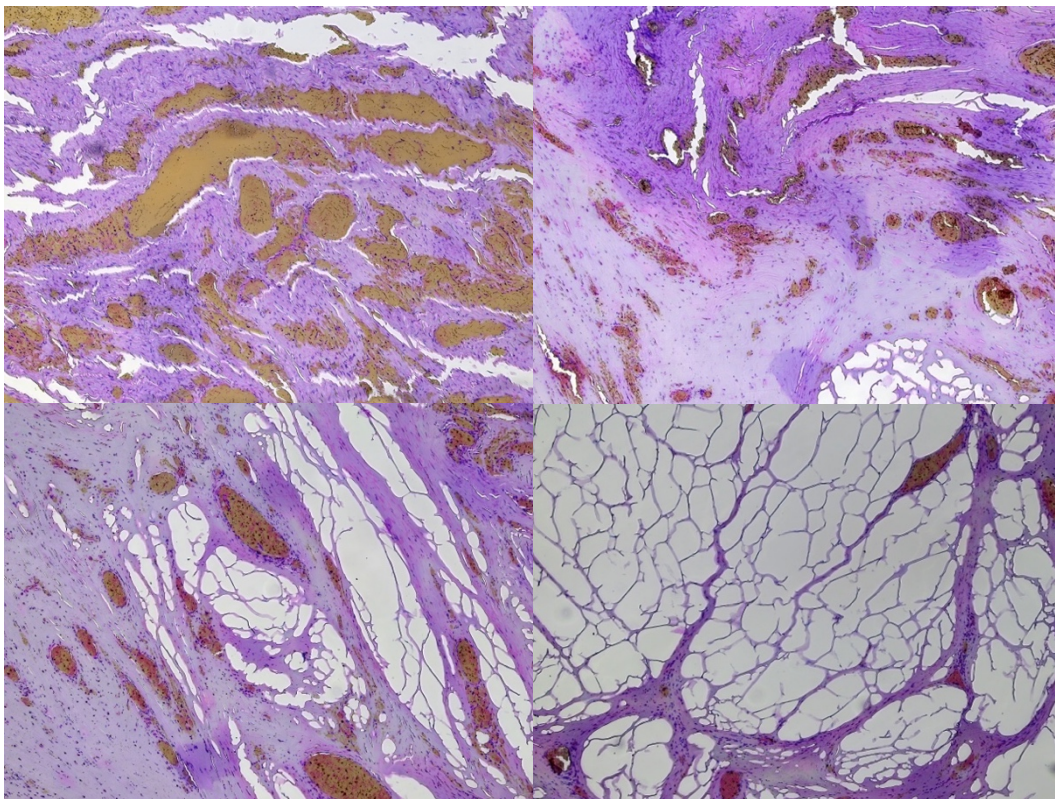
I snittet ble det observert nekrotiske områder som var både delvis cellerike (bildene øverst), samt cellefattige (bildene nederst). Felles for de nekrotiske områdene var den høye andelen bindevev, som infiltrerte det nekrotiske området. I bildene øverst er det mulig å se ansamlinger av forstørrede, nakne cellekjerner, samt en mørkelilla «skygge», som antas å være et artefakt på objektglasset. Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

B₈:



Snittet fra B₈ inneholdt mange nekrotiske områder med strukturer som kunne minne om adipocytter eller bindevev som man finner i adventitia serosa. I disse områdene kunne det også sees noen få spredte, nakne og forstørrede cellekjerner. Bildet er tatt med 10X-objektiv.

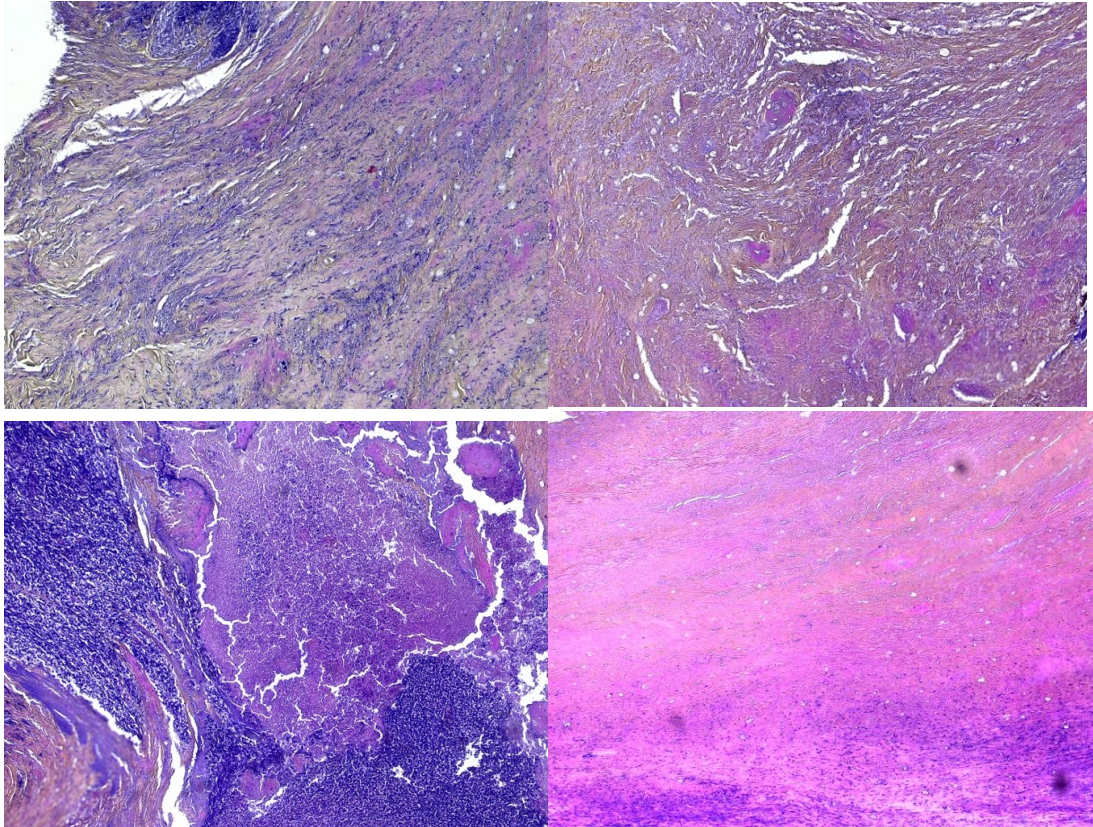
B₁₀:



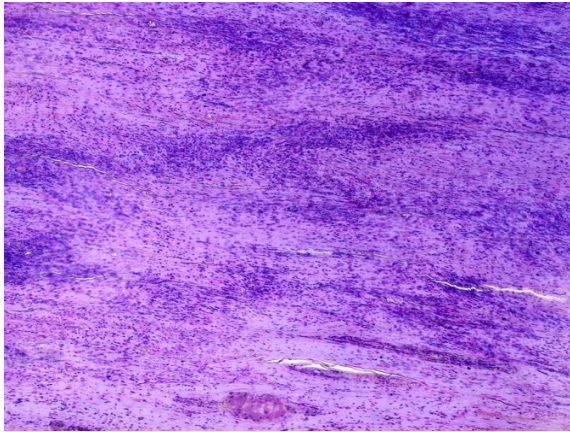
I snittet ble det observert flere områder som fremsto som nekrotiske, hvor det ble observert noen få spredte, nakne og forstørrede cellekjerner, samt flere, store pussansamlinger (bildene øverst). I andre deler av snittet ble det observert flere områder med strukturer som kunne minne om adipocytter eller bindevev som man finner i adventitia serosa (bildene nederst). Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

Vedlegg 3. Vedlegget viser en oversikt over bilder tatt fra vevsblokk C₁-C₁₀, med unntak av C₇. Bildene i vedlegget har ikke blitt diskutert i bachelor-oppgaven og er kun ment som supplerende innhold.

C₁:

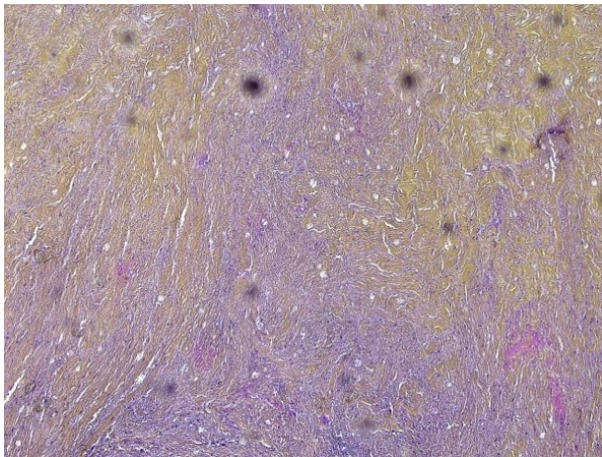


I snittet fra C₁ var det mulig å se flere ulike nekrotiske områder, hvor noen var mer cellefattige og rike på bindevev (bildene øverst), mens andre var mer cellerike og hadde mindre infiltrasjon av bindevev (nederst). I de nekrotiske områdene med bindevev ble det observert noen få spredte, nakne og forstørrede cellekjerner, mens det i de cellerike områdene ble sett større ansamlinger av nakne, forstørrede cellekjerner. I bildet nederst til venstre er det mulig å se et område med en tydelig overgang mellom cellefattig, nekrotisk og rosa område (øverst) og et mer cellerikt, nekrotisk og lilla område (nederst). Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

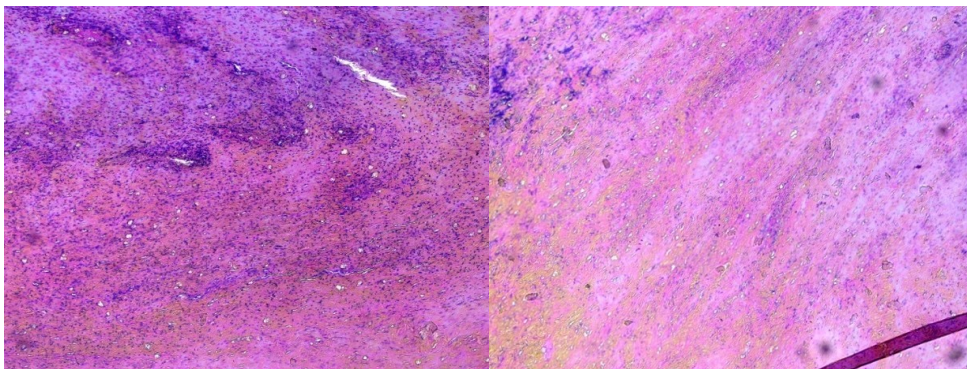


Bildet viser et nekrotisk område med spredte, nakne og forstørrede cellekjerner. Bildet er tatt med 10X-objektiv.

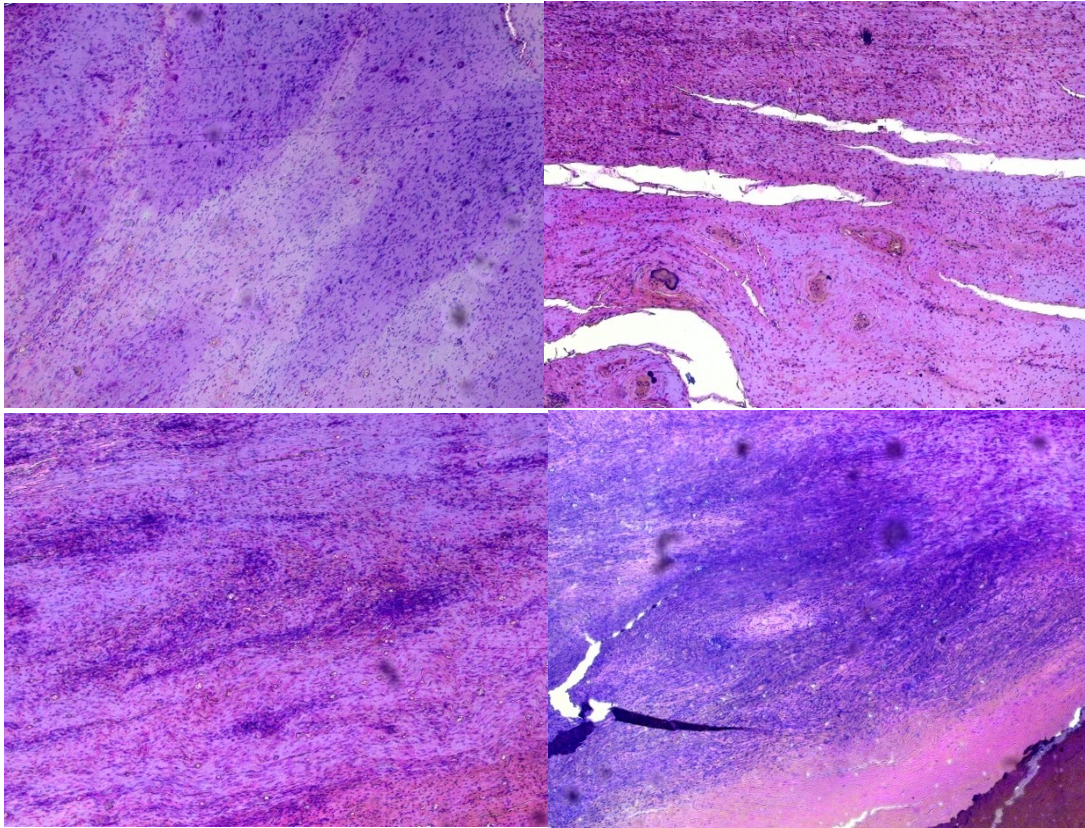
C2:



I snittet fra C₂ ble det funnet nekrotiske områder med større grad av bindevev, samt noen få spredte, nakne og forstørrede cellekjerner. Det ble også observert noen artefakter i form av vanndråper. Bildet er tatt med 10X-objektiv.

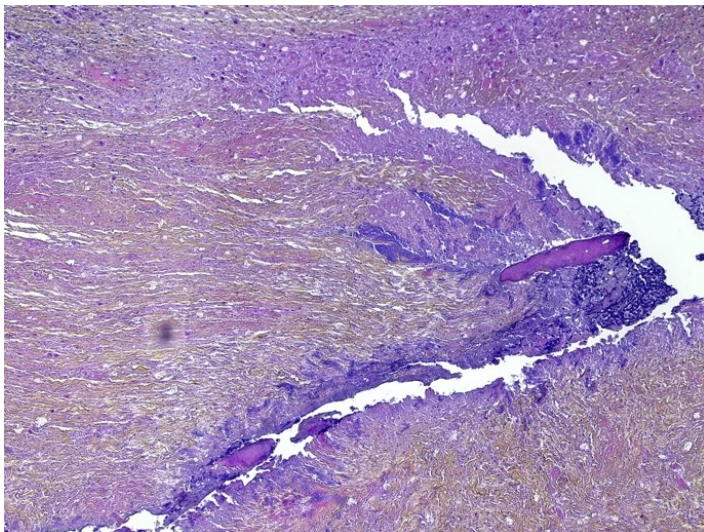


I andre deler av snittet ble det observert nekrotiske områder med mindre grad av bindevev, samt noen få spredte, nakne og forstørrede cellekjerner. Begge bilder er tatt med 10X-objektiv.

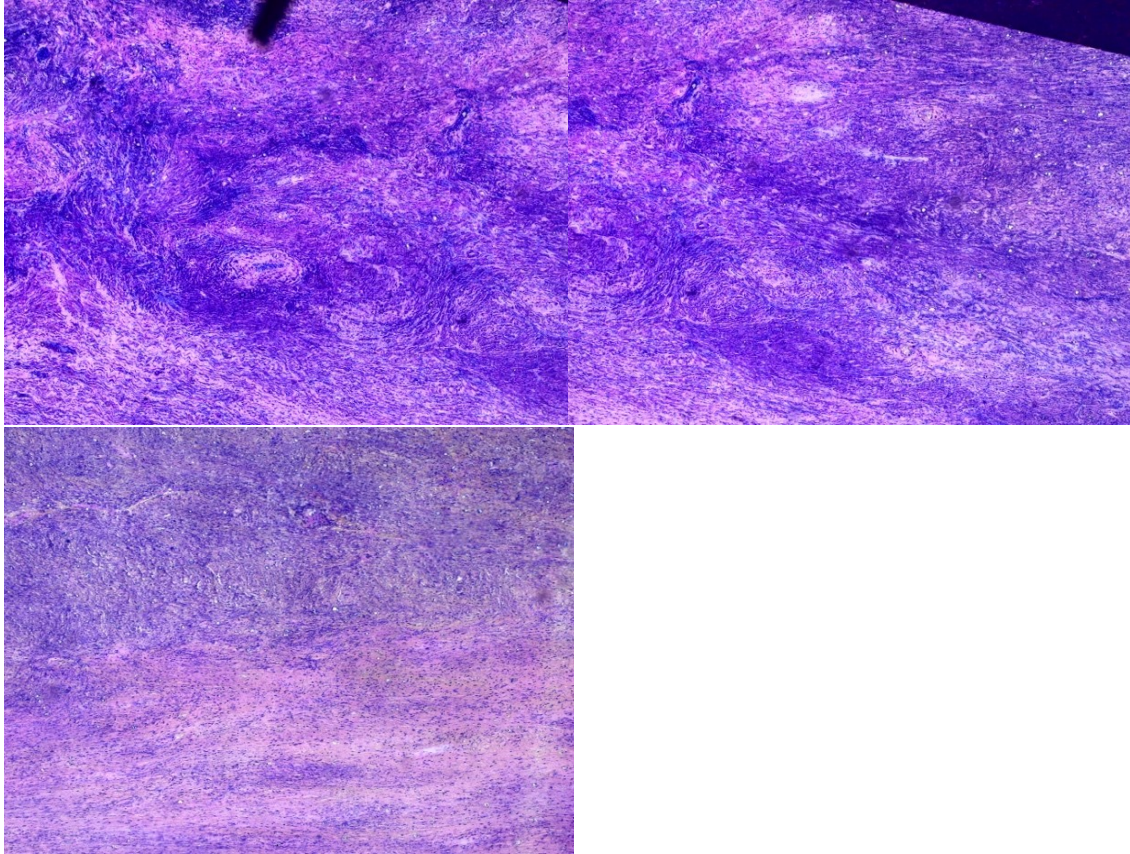


I snittet ble det også observert nekrotiske områder som var cellerike og med liten andel bindevev, hvor enkelte deler inneholdt større ansamlinger av spredte, nakne og forstørrede cellekjerner. Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

C₃:

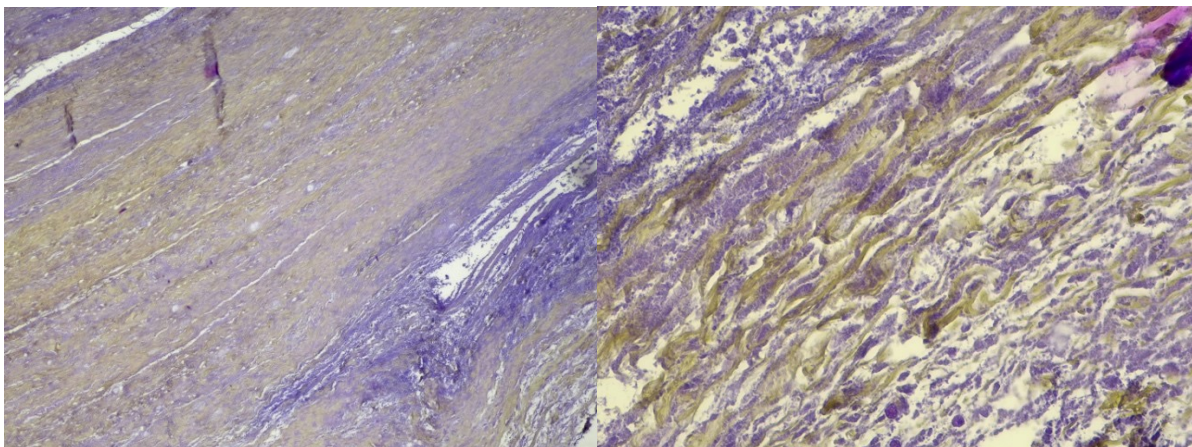


I snittet fra C₃ var det mulig å se flere cellefattige, nekrotiske områder med infiltrasjoner av bindevev. I de cellefattige, nekrotiske områdene kunne enkelte celleansamlinger sees, slik som i sprekken i midten av bildet. Det ble i tillegg observert noen magentafargede strukturer som kunne minne om blodårer. Bildet er tatt med 10X-objektiv.

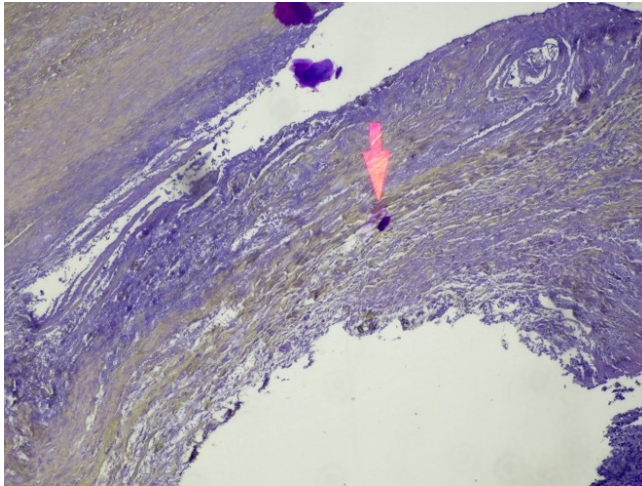


I andre deler av snittet ble det observert nekrotiske områder som var mer cellerike (øverst), samt områder som tydelig viste grensen mellom cellerikt, nekrotisk vev og cellefattig, nekrotisk vev (nederst). Alle disse områdene hadde svært lite bindevev tilstede. I de områdene som var cellerike ble det observert flere strukturer som kunne minne om blodårer (øverst). Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

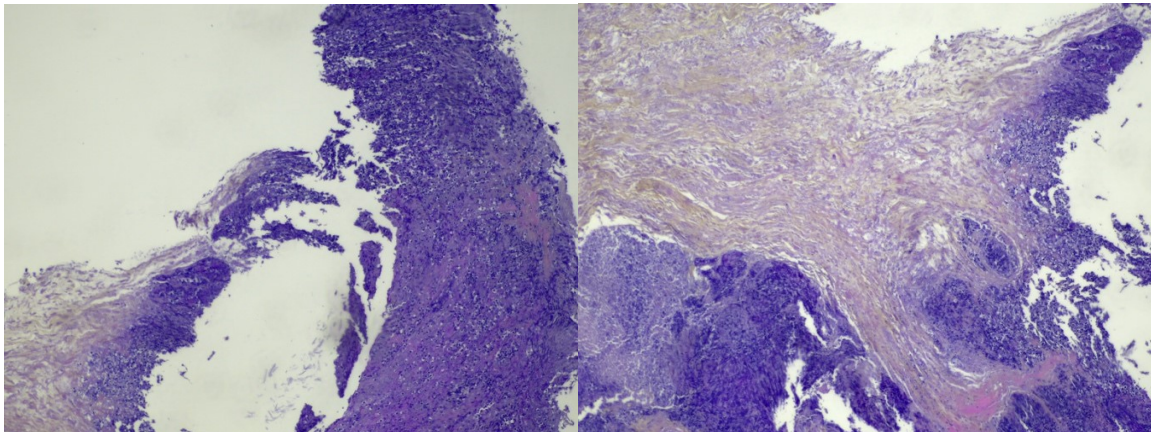
C₄:

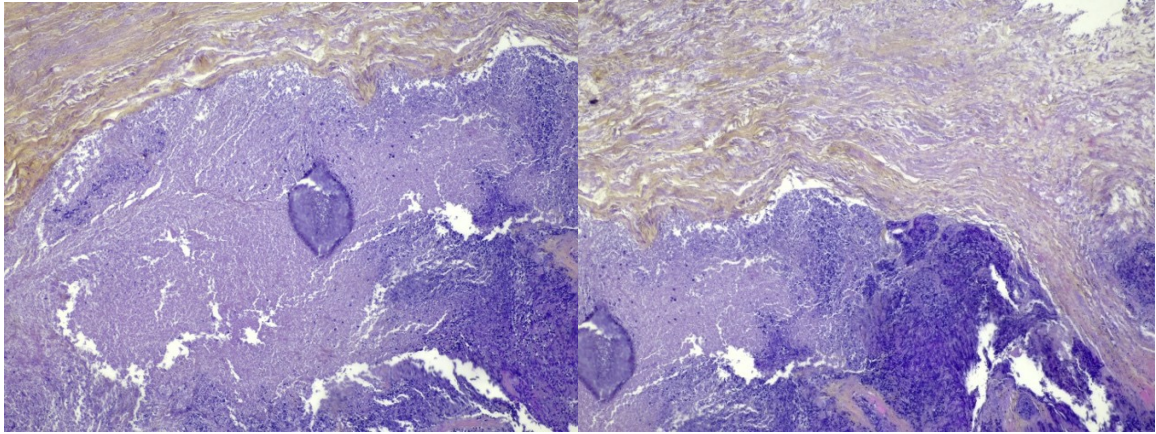


I et område fra snitt C₄ ble det observert et nekrotisk, cellefattig område med bindevev som både var lineært, samt bindevev som hadde lik struktur som friskt bindevev. Området var for det meste cellefattig, men det var mulig å observere noen få spredte, forstørrede og nakne cellekjerner, samt celler med redusert mengde cytoplasma. Bildet til venstre er tatt med 10X-objektiv, mens bildet til høyre er tatt med 40X-objektiv.

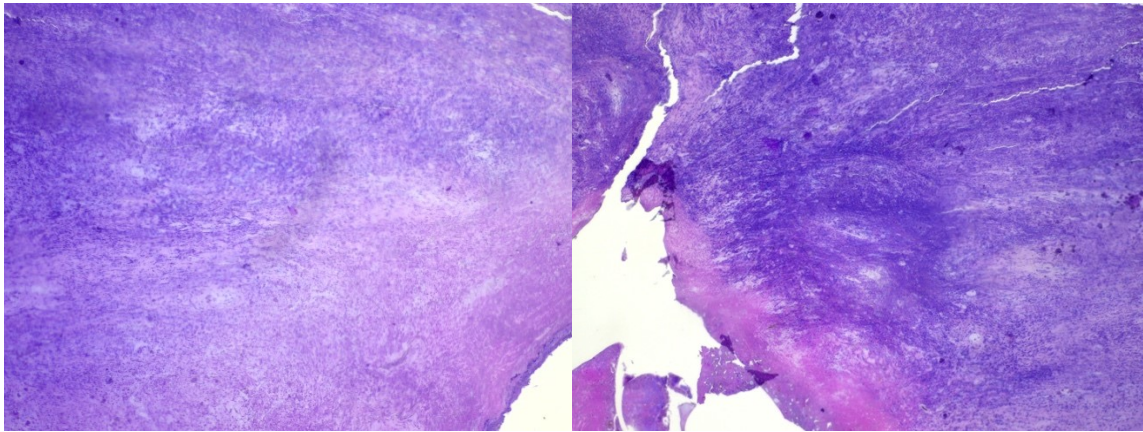


Bildet viser et cellefattig, nekrotisk område med en del bindevev som opptrer som ustrukturert. Langs kanten av vevet kunne det sees større ansamlinger av nakne, forstørrede cellekjerner. Pilen peker på det som så ut som en normal celle, og som var den eneste cellen med disse trekkene som ble observert i dette området. I høyre hjørne kan man se en struktur som minner om en blodåre. Bildet er tatt med 10X-objektiv.

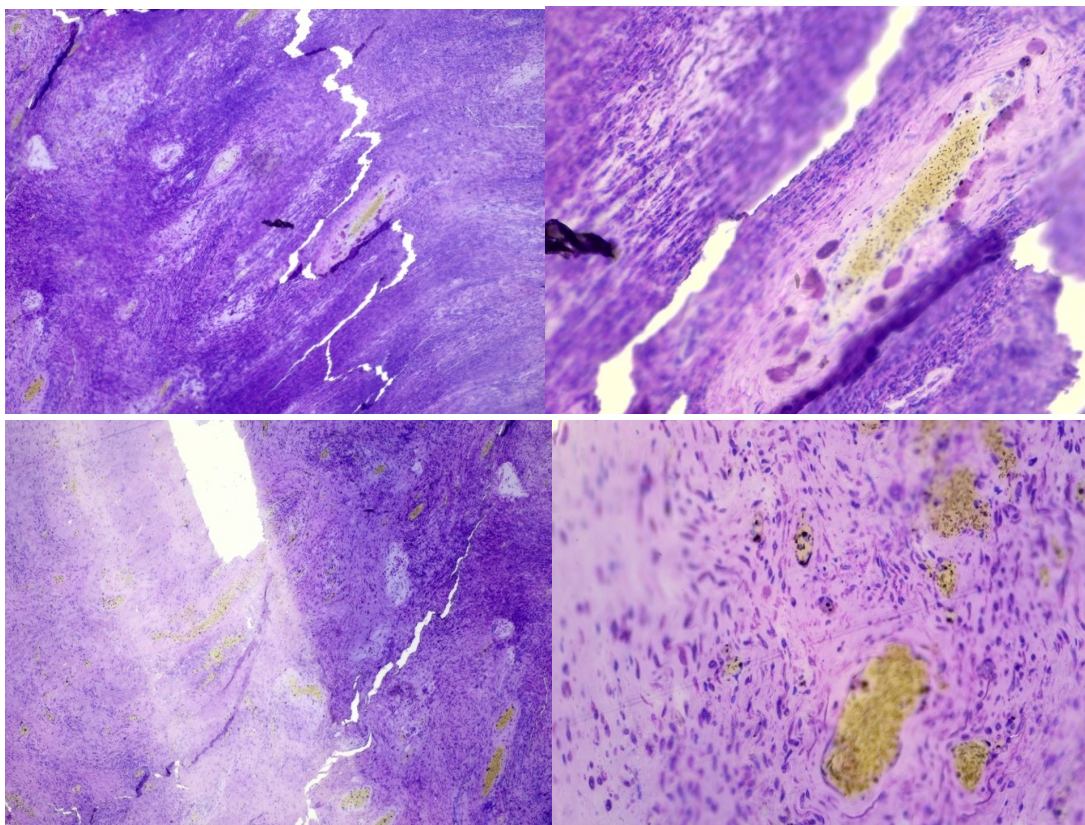




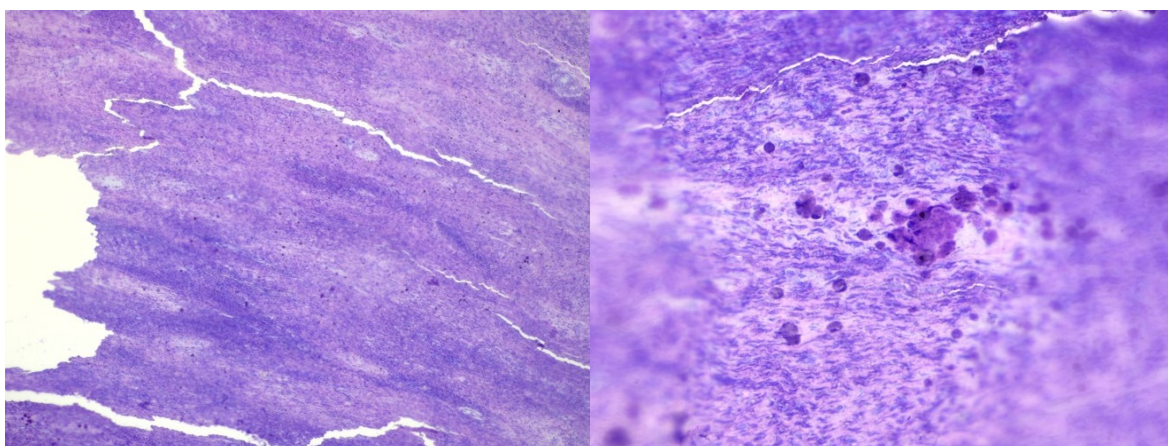
Det ble observert flere cellerike områder med store ansamlinger av nakne, forstørrede kjerner (øverst til venstre), hvor de cellerike områdene grenset mot cellefattige, nekrotiske områder med store mengder lineært og ustrukturert bindevev (resterende bilder). Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.



Likt som med tidligere snitt fra C-blokkene var det mulig å finne områder som tydelig viste hvordan vevet ble forskjøvet fra å være mer cellerikt med mange små, nakne cellekjerner (mørkelilla), til å bli mer nekrotisk og cellefattig (rosa). Begge bildene er tatt med 10X-objektiv.

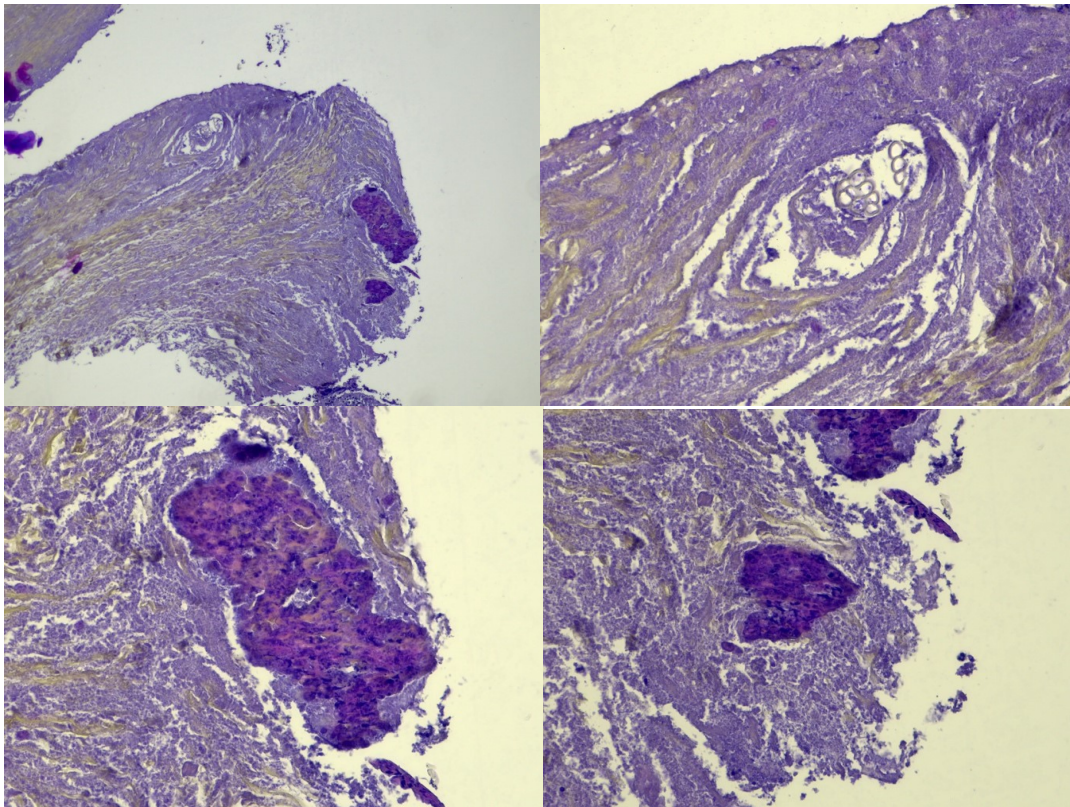


De to bildene øverst viser det samme vevsområdet, hvor bildet til venstre er tatt med 10X-objektiv og bildet til høyre er tatt med 40X-objektiv. I dette området ble det observert svært store celleansamlinger med forstørrede, nakne cellekjerner, hvor disse omkranset en ukjent struktur (venstre). Strukturen hadde et lyst, grått cytoplasma med en mørk, gul farge i midten og noen brune korn. I et annet nekrotisk område ble det observert flere pussansamlinger (bilde nederst til venstre), hvor det ved 40X-objektiv ble tydelig at det nekrotiske området også inneholdt flere spredte celler, hvor noen var nakne og forstørret, og andre hadde en liten andel cytoplasma (bildet nederst til høyre). I bildet nederst til venstre blir det tydelige skillet mellom mer cellerike områder med store ansamlinger av nakne, forstørrede cellekjerner og cellefattige, nekrotiske områder vist.



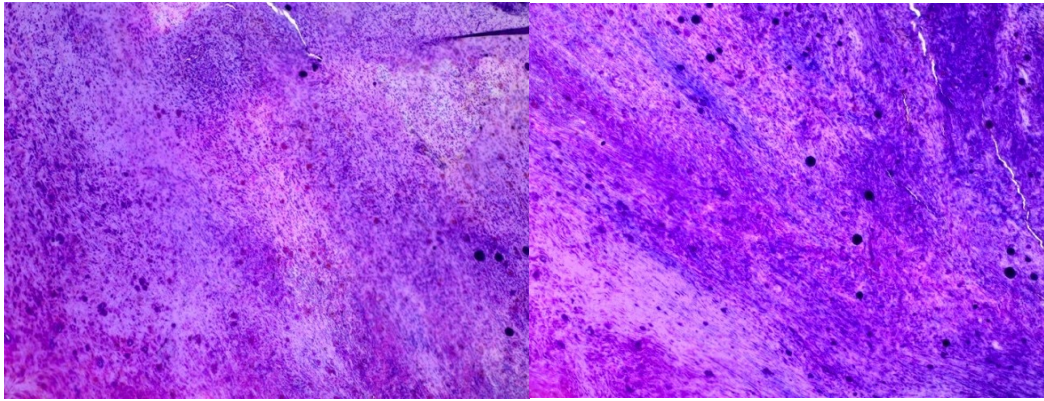
Bildene viser et nekrotisk område som opptrer som cellefattig i øvre del av snittet, og som gradvis blir mer cellerikt i nedre del av snittet (venstre). Det sees også noen ansamlinger av

nakne cellekjerner. I bildet til høyre har samme området blitt mikroskopert ved 40X, hvor det ble observert flere celler med cytoplasma og forstørret kjerne. Disse cellene ble både observert som enkeltstående og gruppert.

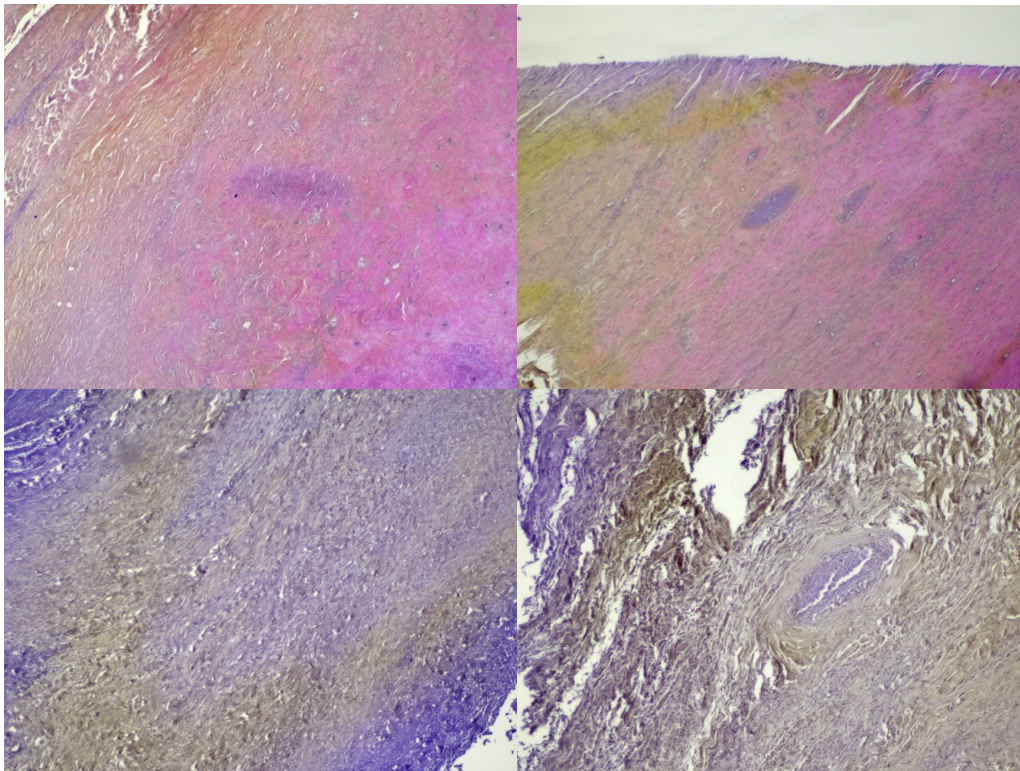


I ytterkanten av snittet ble det observert et område med nekrotisk område med en del bindevev, samt en kraftig lillafarget struktur med en større ansamling av celler med ulik størrelse på cellekjernen og cytoplasma (øverst til venstre og de to nederste bildene). I bildet øverst til høyre ble det observert et område med noen kubiske, blanke strukturer, og som mistenkes å være artefakt i form av tau. Bildet øverst til venstre er tatt med 10X-objektiv, mens de resterende tre bildene er tatt med 40X-objektiv.

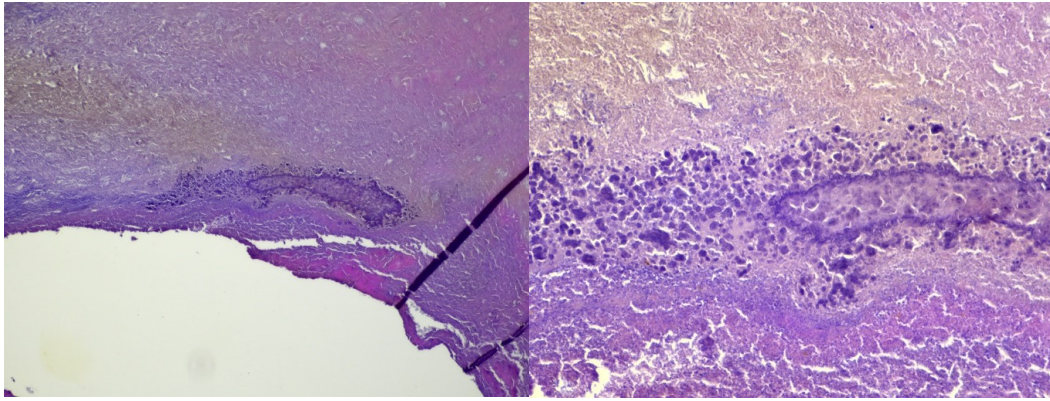
Cs:



I snittet fra C₅ ble det observert flere nekrotiske områder uten bindevev, og som inneholdt noen spredte, nakne og forstørrede cellekjerner. Det ble i tillegg observert en del artefakter i form av fargenedslag, noe som vises som sirkulære strukturer som er kraftig farget lilla. Begge bildene er tatt med 10X-objektiv.

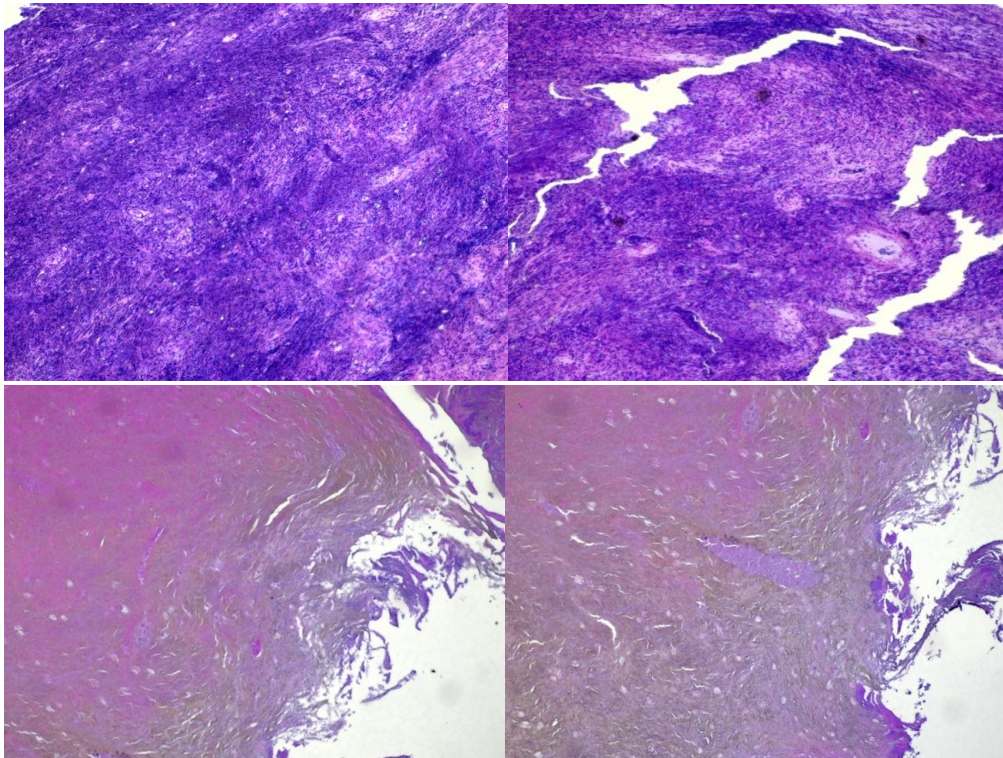


I andre områder av snittet ble det observert nekrotiske områder som var svært cellefattig med infiltrasjoner av bindevev (bildene øverst), men det ble også observert nekrotiske områder som var mer cellerike med nakne, forstørrede cellekjerner (bildene nederst). Også disse områdene hadde en del bindevev, hvor bindevevet virket å være ustrukturert (bilde nederst til høyre). I det samme området med det ustrukturerte bindevevet ble det også observert en struktur med en større celleansamling i midten omkranset av sirkulært bindevev, som kunne minne om en blodåre. Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

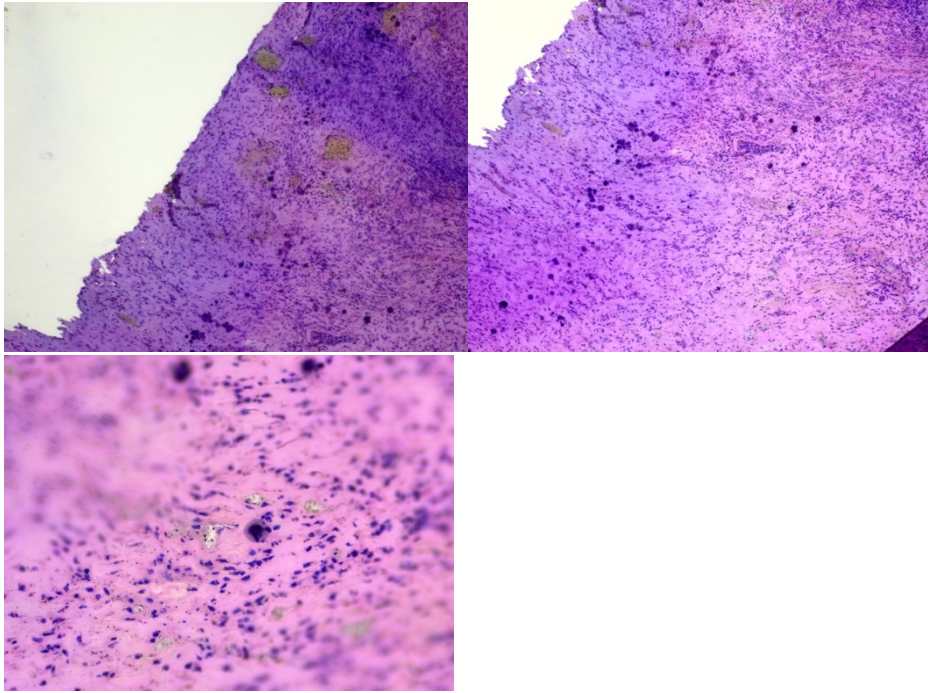


I ytre del av snittet ble det observert en fremmed struktur med 10X-objektiv i et nekrotisk område (bildet til venstre). Ved 40X-objektiv ble det observert at fremmedstrukturen inneholdt flere nakne, forstørrede cellekjerne (bildet til høyre). Nært fremmedstrukturen ble det observert noe bindevev, samt vev som var oppstykket og med flere åpenrom.

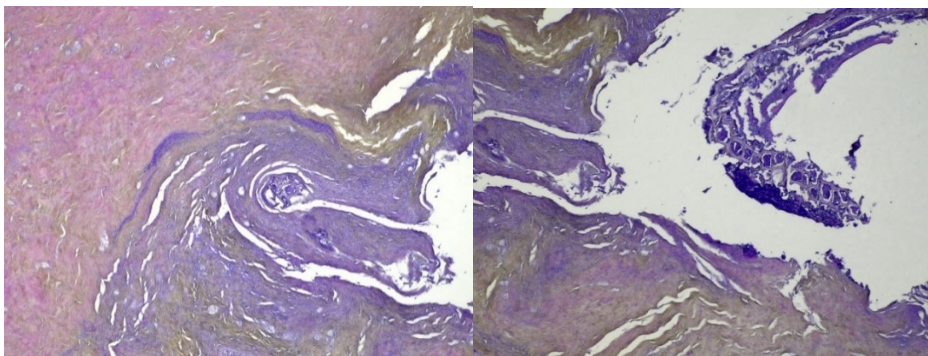
C₆:



I snittet fra C₆ ble det observert nekrotiske områder som var både cellerike med flere nakne, forstørrede cellekjerne og ikke noe bindevev (bildene øverst), samt områder som var mer cellefattige og rikt på bindevev (bildene nederst). I begge disse områdene ble det observert sirkulære strukturer som kunne minne om blodårer. I enkelte av områdene kunne det sees artefakter i form av vanddråper (bildene nederst). Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

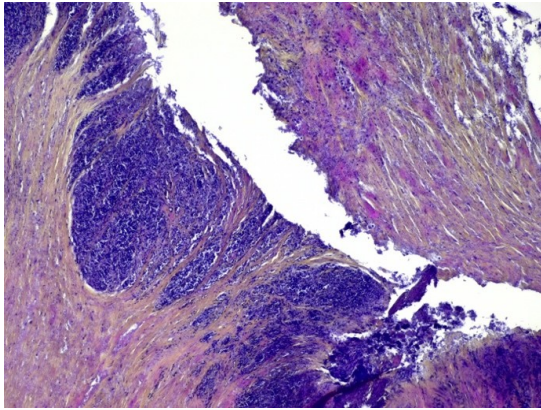


I de nekrotiske, cellerike områdene ble det observert enkelte pussansamlinger, samt artefakter i form av fargenedslag (bildene øverst). I de cellerike områdene var cellekjernene små og nakne. I ett av disse nekrotiske, cellerike områdene ble det også observert en celle med økt N/C-ratio, omkranset av noen grå fremmedstrukturer med 40X-objektiv (bildet nederst). De to bildene øverst er tatt med 10X-objektiv.

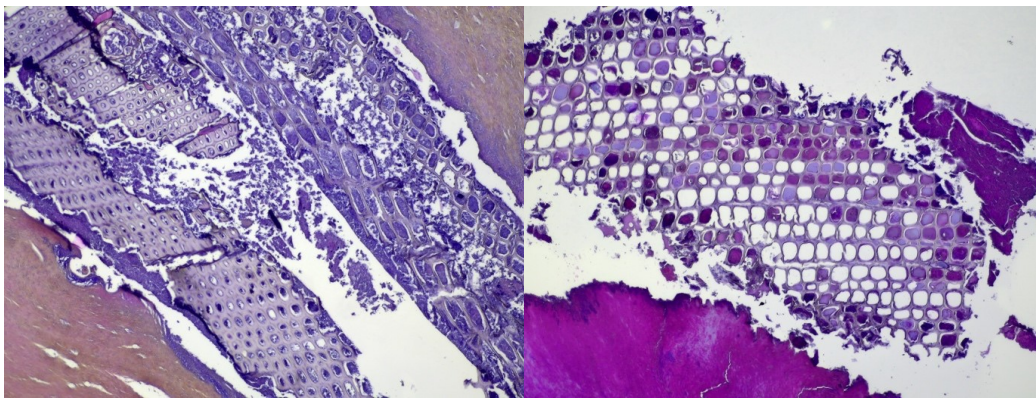


I bildene sees to ulike, nekrotiske områder. I bildet til høyre vises et cellefattig, nekrotisk område til venstre i bildet, med et mer cellerikt, nekrotisk område til høyre i bildet. Det sees noe bindevev rundt i de to nekrotiske områdene. Midt i bildet sees et fremmedlegeme av ukjent opprinnelse, men som mistenkes å være tau. I bildet til venstre vises et nekrotisk område som er litt mer cellerikt, med en del bindevev i nedre del av bildet. Også her sees et fremmedlegeme av ukjent opprinnelse i sentrum av bildet, og som mistenkes å være tau. Dette kunne observeres i flere C-snitt. Begge bildene er tatt med 10X-objektiv.

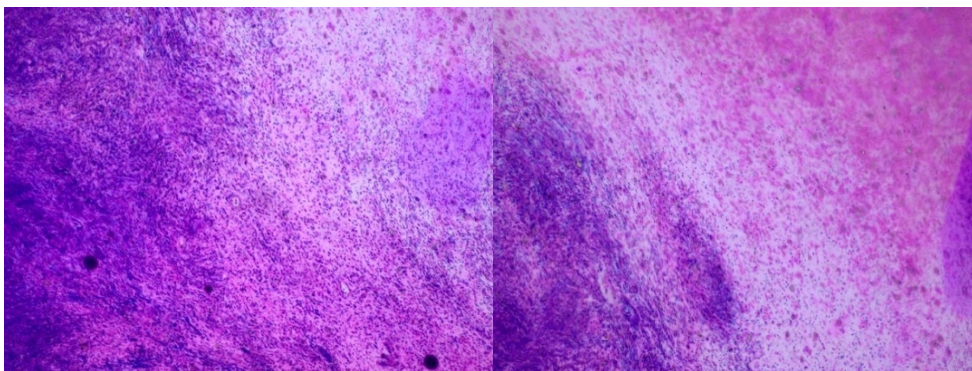
C8:



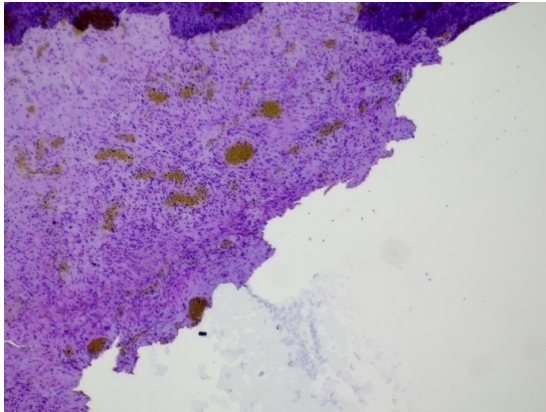
I bildet er det mulig å se store ansamlinger av nakne, forstørrede cellekjerner i et nekrotisk område, hvor det befant seg en del bindevev under disse ansamlingene. Til venstre i bildet sees et mer cellefattig, nekrotisk område med lineært og oppstykket bindevev. Bildet er tatt med 10X-objektiv.



I flere områder i snittet ble det observert fremmedlegemer av ukjent opprinnelse, hvor disse ble konkludert med å være fra tauet som ble brukt til å avgrense sarkomet. Tauet kunne også sees makroskopisk i form av en rød farge på deler av snittet.

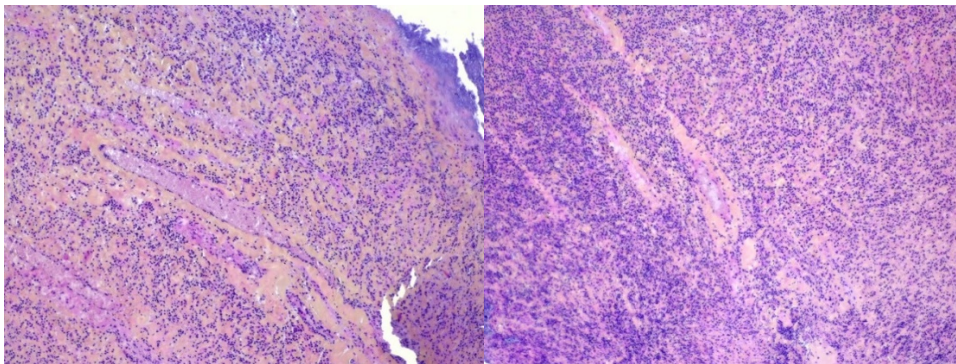


Som med tidligere snitt var det mulig å se flere tydelige skiller mellom nekrotisk, cellefattig vev og nekrotisk, cellerikt vev. Bildene er tatt med 10X-objektiv.

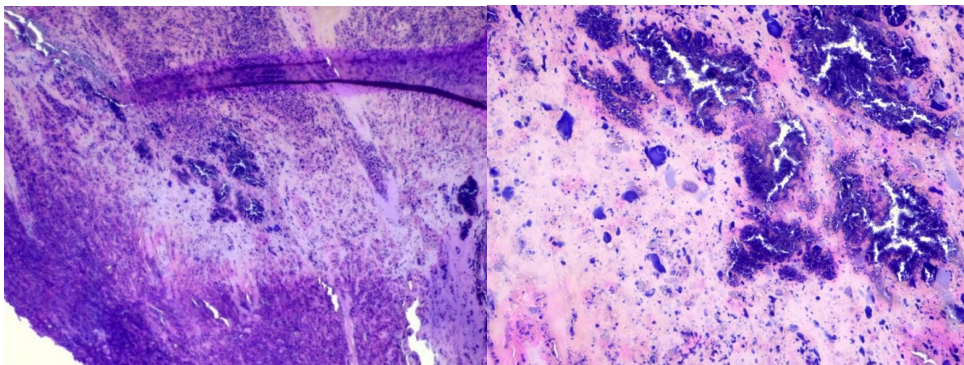


Også i dette snittet ble det observert nekrotiske områder med spredte, nakne og forstørrede cellekjerner som også inneholdt pussansamlinger. Bildet er tatt med 10X-objektiv.

C₉:

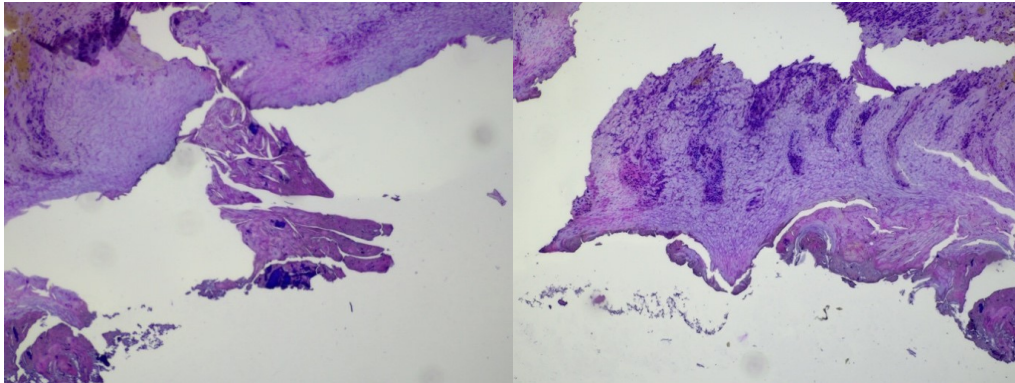


I snittet fra C₉ ble cellebildet litt annerledes, hvor de nekrotiske områdene med forstørrede, nakne cellekjerner inneholdt langt større mengder bindevev. I flere av disse områdene ble det også observert strukturer som kunne minne om blodårer. Bildene er tatt med 10X-objektiv.

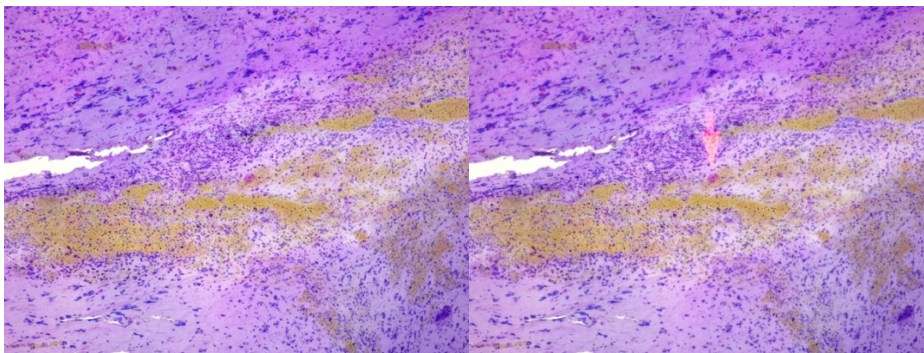


I andre deler av de nekrotiske områdene som var cellerike ble det observert ansamlinger av det som så ut som mange celler ved 10X-objektiv (bildet til venstre). Ved forstørrelse med

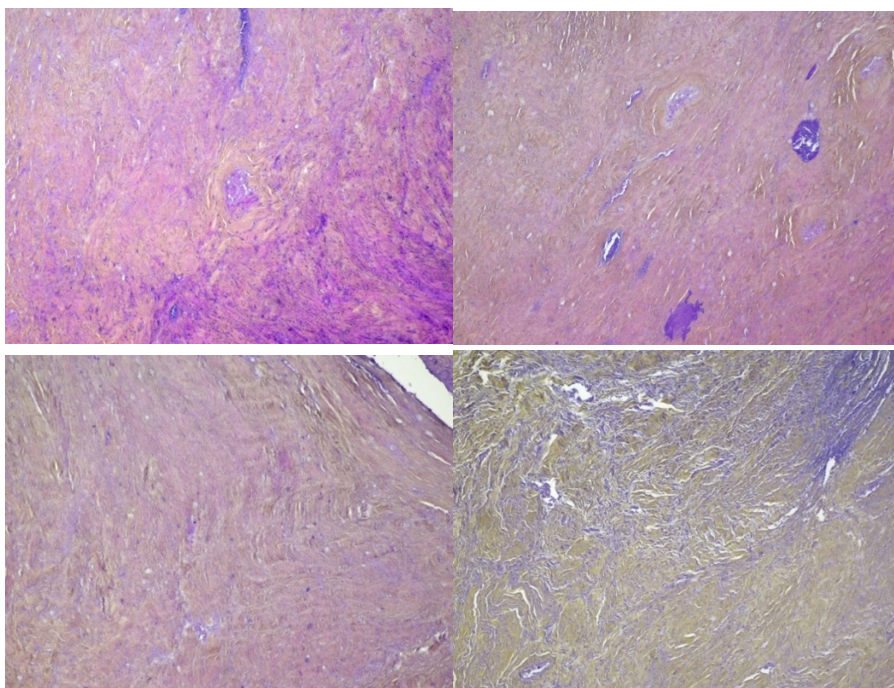
40X-objektiv så disse ansamlingene ut til å bestå av flere forstørrede, nakne cellekjerne. I dette nekrotiske området ble det ellers observert lite bindevev.



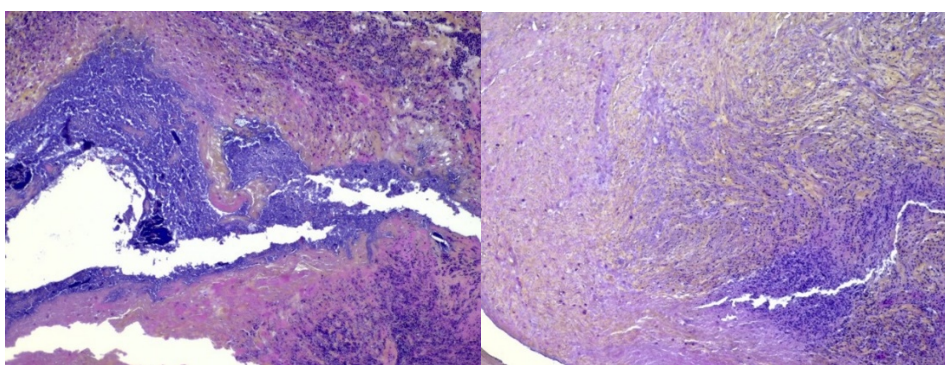
I de nekrotiske områdene som inneholdt celler ble det observert flere pussansamlinger (bildet til venstre), samt større ansamlinger av nakne, forstørrede cellekjerne (bildet til høyre). Begge bildene er tatt med 10X-objektiv.



Bildene viser igjen et nekrotisk område med noen spredte, nakne og forstørrede cellekjerne, samt en del pussansamlinger. I bildet til høyre peker pilen på en normal celle, hvor denne var den eneste normale cellen som ble observert i dette området. Begge bildene er tatt med 10X-objektiv.

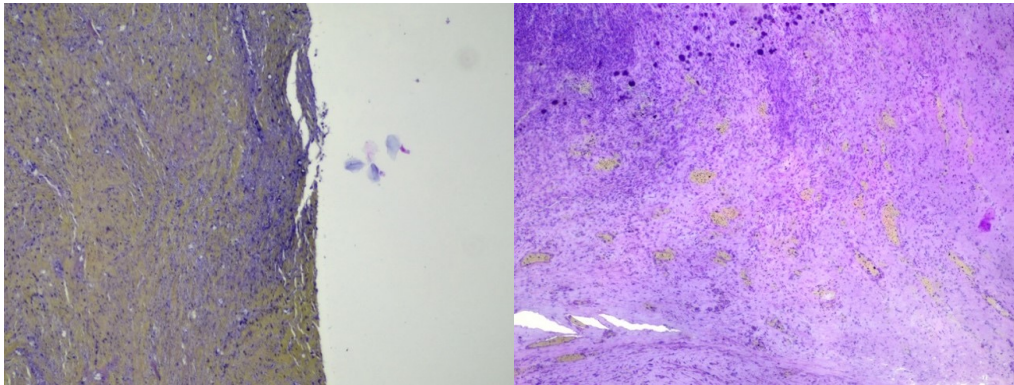


I andre områder av snittet var vevet nekrotisk og cellefattig, men rikt på bindevev som var mer lineært. I en del av det nekrotiske, cellefattige området ble det kun observert bindevev, hvor bindevevet var noe ustrukturert og oppstykket (bildet nederst til høyre). I flere av de nekrotiske, cellefattige områdene ble det observert strukturer som kunne minne om blodårer. Alle bildene er tatt med 10X-objektiv.

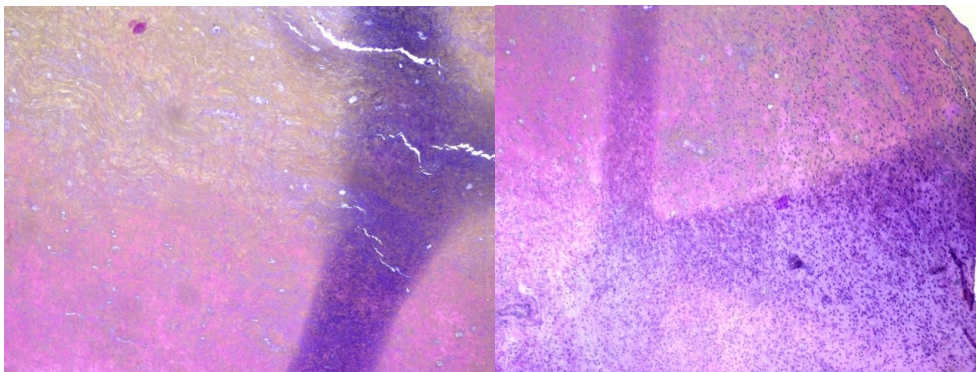


I bildet til venstre vises et område hvor deler av vevet er mer cellerikt med nakne, forstørrede cellekjerne (mørkelilla område), mens andre deler er mer cellefattige og inneholder en del bindevev (de rosa områdene). I bildet til høyre vises et nekrotisk område hvor det er noen celleansamlinger med nakne, forstørrede cellekjerne (mørkelilla prikker). I det nekrotiske området sees mye bindevev som er lineært. Begge bildene er tatt med 10X-objektiv.

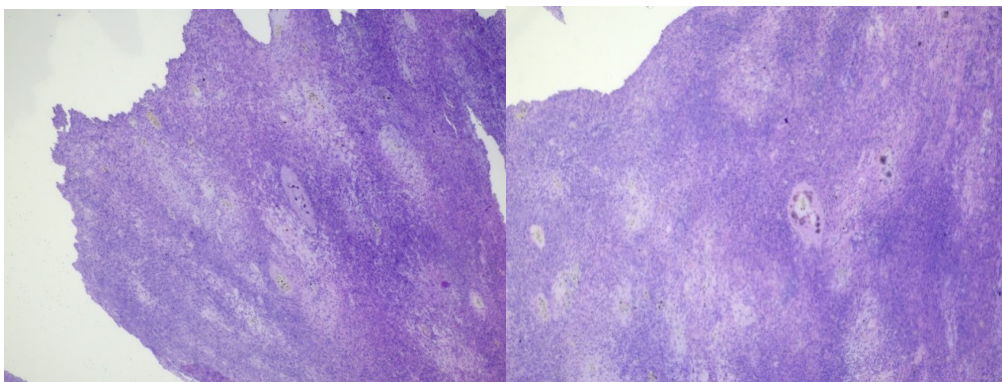
C10:



I bildet til venstre er det mulig å se et nekrotisk område med stor mengde bindevev, samt noen spredte, nakne og forstørrede cellekjerne. I bildet til høyre vises et annet nekrotisk, cellefattig område, hvor det sees en større ansamling av nakne, forstørrede cellekjerne øverst til venstre i bildet. I det samme bildet sees flere spredte, nakne cellekjerne i det nekrotiske vevet, samt flere pussansamlinger. Det kan også sees noe fargenedslag øverst til venstre i bildet. Begge bildene er tatt med 10X-objektiv.



Bildet til venstre viser et nekrotisk, cellefattig område med mye bølgete bindevev. I bildet til høyre vises et mer cellerikt, nekrotisk område med spredte, nakne og forstørrede cellekjerne. Den lille stripen som vises i begge bildene, kan være et artefakt på snittet. Begge bildene er tatt med 10X-objektiv.



Begge bildene viser et cellerikt, nekrotisk område på vevet rikt på nakne, forstørrede cellekjerner. Spredt i begge bildene kan det sees noen pussansamlinger, samt strukturer som kan minne om blodårer. Begge bildene er tatt med 10X-objektiv.

Vedlegg 4. Vedlegget viser oversikten og resultatene fra RT-LAMP. Det ble utført analyse for BPV-1, -2 og -13.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
BPV1	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq		
C												
BPV2	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc		
E												
BPV13	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq		
G												
H												

LB/FB	10	uM
FIP/BIP	40	uM
L3/B3	10	uM
DNA	2	ul

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
BPV1	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq		
C												
BPV2	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq		
E												
BPV13	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq		
G												
H												

LB/FB	15	uM	LB/FB	15	uM
FIP/BIP	50	uM	FIP/BIP	40	uM
L3/B3	15	uM	L3/B3	15	uM
DNA	2	ul	DNA	2	ul

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
BPV1	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq		
C												
BPV2	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc		
E												
BPV13	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq		
G												
H												

LB/FB	8	uM	LB/FB	8	uM
FIP/BIP	36	uM	FIP/BIP	40	uM
L3/B3	8	uM	L3/B3	8	uM
DNA	2	ul	DNA	2	ul

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
BPV1	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq
C												
BPV2	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc
E												
BPV13	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq
G												
H												

LB/FB	10	uM	LB/FB	10	uM	LB/FB	10	uM
FIP/BIP	40	uM	FIP/BIP	40	uM	FIP/BIP	40	uM
L3/B3	10	uM	L3/B3	10	uM	L3/B3	10	uM
DNA	1	ul	DNA	1,5	ul	DNA	3	ul

Vedlegg 5. Vedlegget viser fremgangsmåten for ekstraksjon av DNA fra Qiagen.
Fremgangsmåten ble fulgt for å ekstrahere DNA til RT-LAMP.

July 2020

DNeasy[®] Blood & Tissue Handbook

DNeasy Blood & Tissue Kit
DNeasy 96 Blood & Tissue Kit
For purification of total DNA from
animal blood
animal tissue
rodent tails
ear punches
cultured cells
fixed tissue
bacteria
insects

— Sample to Insight —



Contents

Kit Contents	4
Storage	6
Intended Use	6
Safety Information.....	7
Quality Control.....	7
Introduction.....	8
Principle and procedure	9
Description of protocols.....	11
Automated purification of DNA on QIAcube Instruments	12
Equipment and Reagents to Be Supplied by User	13
Important Notes.....	15
Sample collection and storage	15
Starting amounts of samples	15
Maximum amount of starting material	15
Very small sample sizes.....	16
Quantification of starting material	17
Preparation of Buffer AW1 and Buffer AW2.....	18
Buffer AL	19
Proteinase K.....	19
Copurification of RNA	20
Centrifugation (DNeasy 96 procedures).....	21
Elution of pure nucleic acids	23

Expected yields	24
Purification of high-molecular-weight DNA.....	25
Protocol: Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol)	26
Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol).....	30
Protocol: Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (DNeasy 96 Protocol).....	34
Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (DNeasy 96 Protocol)	39
Protocol: Pretreatment for Paraffin-Embedded Tissue.....	46
Protocol: Pretreatment for Formalin-Fixed Tissue.....	48
Protocol: Pretreatment for Gram-Negative Bacteria	49
Protocol: Pretreatment for Gram-Positive Bacteria.....	50
Troubleshooting Guide	52
Appendix A: Determination of Yield, Purity and Length of DNA.....	56
Appendix B: Cleaning S-Blocks	58
Ordering Information	59
Document Revision History.....	63

Kit Contents

DNeasy Blood & Tissue Kit	(50)	(250)
Catalog no.	69504	69506
Number of preps	50	250
DNeasy Mini Spin Columns (colorless) in 2 ml Collection Tubes	50	250
Collection Tubes (2 ml)	100	500
Buffer ATL	14 ml	50 ml
Buffer AL*	12 ml	2 x 33 ml
Buffer AW1 (concentrate)*†	19 ml	98 ml
Buffer AW2 (concentrate)†‡	13 ml	66 ml
Buffer AE	2 x 15 ml	2 x 60 ml
Proteinase K	1.25 ml	6 ml
Quick-Start Protocol	1	1

* Contains a chaotropic salt. Not compatible with disinfecting agents containing bleach. See page 7 for safety information.

† Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Add ethanol (96–100%) according to the bottle label before use to obtain a working solution.

‡ Contains sodium azide as a preservative.

Storage

DNeasy spin columns, DNeasy 96 plates and all buffers should be stored dry, at room temperature (15–25°C) and are stable for 1 year under these conditions, if not otherwise stated on the label.

DNeasy Blood & Tissue Kits contain a ready-to-use Proteinase K solution, which is supplied in a specially formulated storage buffer. Proteinase K is stable for at least 1 year after delivery when stored at room temperature. For storage longer than one year or if ambient temperatures often exceed 25°C, we suggest storing Proteinase K at 2–8°C.

Intended Use


DNeasy Blood & Tissue Kit and DNeasy 96 Blood & Tissue Kit are intended for molecular biology applications. This product is not intended for the diagnosis, prevention or treatment of a disease.

QIAcube® Connect is designed to perform fully automated purification of nucleic acids and proteins in molecular biology applications. The system is intended for use by professional users trained in molecular biological techniques and the operation of QIAcube Connect.

All due care and attention should be exercised in the handling of the products. We recommend all users of QIAGEN® products to adhere to the NIH guidelines that have been developed for recombinant DNA experiments or to other applicable guidelines.

Safety Information

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves and protective goggles. For more information, please consult the appropriate safety data sheets (SDSs). These are available online in convenient and compact PDF format at www.qiagen.com/safety where you can find, view and print the SDS for each QIAGEN kit and kit component.

<p>CAUTION</p> 	<p>DO NOT add bleach or acidic solutions directly to the sample preparation waste.</p>
---	--

Buffers AL and AW1 contain guanidine salts, which can form highly reactive compounds when combined with bleach. If liquid containing these buffers is spilt, clean with a suitable laboratory detergent and water. If the spilt liquid contains potentially infectious agents, clean the affected area first with laboratory detergent and water, and then with 1% (v/v) sodium hypochlorite.

Quality Control

In accordance with QIAGEN's ISO-certified Quality Management System, each lot of the DNeasy Blood & Tissue Kit and DNeasy 96 Blood & Tissue Kit is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

Description of protocols

Different protocols in this handbook provide detailed instructions to use DNeasy Kits for purification of total DNA.

- “Protocol: Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol)”, page 26, is for use with the DNeasy Blood & Tissue Kit, for purification of DNA from animal blood (with nucleated or non-nucleated erythrocytes) or from cultured animal or human cells.
- “Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)”, page 30, is for use with the DNeasy Blood & Tissue Kit, for purification of DNA from animal tissues, including rodent tails.
- “Protocol: Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (DNeasy 96 Protocol)”, page 34, is for use with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit, for high-throughput purification of DNA from animal blood (with nucleated or non-nucleated erythrocytes) or from cultured animal or human cells.
- “Protocol: Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (DNeasy 96 Protocol)”, page 39, is for use with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit, for high-throughput purification of DNA from animal tissues, including rodent tails.

Pretreatment and specialized protocols

There are several pretreatment protocols included in this handbook, which are optimized for specific sample types. These pretreatment protocols are used in conjunction with one of the DNA purification protocols described above.

The following pretreatment protocols are included in this handbook.

- Pretreatment for Paraffin-Embedded Tissue, page 46
- Pretreatment for Formalin-Fixed Tissue, page 48
- Pretreatment for Gram-Negative Bacteria, page 49
- Pretreatment for Gram-Positive Bacteria, page 50

Equipment and Reagents to Be Supplied by User

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves and protective goggles. For more information, consult the appropriate material safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

For all protocols

- Pipettes and pipette tips
- Vortexer
- Ethanol (96–100%) *
- **Optional:** RNase A (100 mg/ml; cat. no. 19101)

For DNeasy Blood & Tissue Kit (spin column) protocols

- Microcentrifuge tubes (1.5 ml or 2 ml)
- Microcentrifuge with rotor for 1.5 ml and 2 ml tubes
- Thermomixer, shaking water bath or rocking platform for heating at 56°C

For DNeasy 96 Blood & Tissue Kit protocols

- Centrifuge 4-16S or 4-16KS with Plate Rotor 2 x 96 (see page 21)
- Multichannel pipette with extended tips

For efficient processing, we recommend the use of an electric multichannel pipette with a capacity of at least 1 ml per pipette tip. Options include the Matrix Impact® cordless electronic multichannel pipette, which has a unique, adjustable tip-spacing system allowing the user to transfer liquid directly from sample tubes to 96-well plates.

* Do not use denatured alcohol, which contains other substances, such as methanol or methylethylketone.

Quantification of starting material

Weighing tissue or counting cells is the most accurate way to quantify starting material. However, the approximate guidelines given below can also be followed.

Animal tissue

A 2 mm cube (approximately this size: ■; volume, approximately 8 mm³) of most animal tissues weighs approximately 10–15 mg.

Cells from cell culture

The number of HeLa cells obtained in various culture dishes after confluent growth is given in Table 2.

Table 2. Growth area and number of HeLa cells in various culture dishes

Cell culture vessel	Growth area* (cm ²)	Number of cells [†]
Multiwell plates		
96-well	0.32–0.6	4–5 × 10 ⁴
48-well	1	1 × 10 ⁵
24-well	2	2.5 × 10 ⁵
12-well	4	5 × 10 ⁵
6-well	9.5	1 × 10 ⁶
Dishes		
35 mm	8	1 × 10 ⁶
60 mm	21	2.5 × 10 ⁶
100 mm	56	7 × 10 ⁶
145–150 mm	145	2 × 10 ⁷
Flasks		
40–50 ml	25	3 × 10 ⁶
250–300 ml	75	1 × 10 ⁷
650–750 ml	162–175	2 × 10 ⁷

* Per well, if multiwell plates are used; varies slightly depending on the supplier.

† Cell numbers given are for HeLa cells (approximate length = 15 μm) assuming confluent growth. Cell numbers vary since animal cells can vary in length from 10 to 100 μm.

Protocol: Pretreatment for Formalin-Fixed Tissue

This protocol is designed for purification of total DNA from fixed, paraffin-embedded tissues. The protocol describes the preliminary washing with PBS to remove the fixative.

Important points before starting

- The length of DNA purified from fixed tissues is usually <650 bp, depending on the type and age of the sample and the quality of the fixative used.
- Use of fixatives, such as alcohol and formalin, is recommended. Fixatives that cause cross-linking, such as osmic acid, are not recommended as it can be difficult to obtain amplifiable DNA from tissue fixed with these agents.
- Lysis time will vary from sample to sample depending on the type of tissue processed.
- Yields will depend both on the size and the age of the sample processed. Reduced yields compared with fresh or frozen tissues are to be expected. Therefore, eluting purified DNA in a total volume of 50–100 µl Buffer AE is recommended.
- This pretreatment protocol has not been thoroughly tested and optimized for high-throughput DNA purification using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit. As a general guideline, we recommend decreasing the amount of starting material when using this protocol with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit.

Procedure

1. Wash the sample (not more than 25 mg) twice in PBS to remove the fixative.
2. Discard the PBS and continue with step 1 of the protocol “Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)”, page 30.

Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)

This protocol is designed for purification of total DNA from animal tissues, including rodent tails.

Important points before starting

- If using the DNeasy Blood & Tissue Kit for the first time, read “Important Notes” (page 15).
- For fixed tissues, refer to the pretreatment protocols “Pretreatment for Paraffin Embedded Tissue”, page 46, and “Pretreatment for Formalin-Fixed Tissue”, page 48.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C) in a microcentrifuge.
- Vortexing should be performed by pulse-vortexing for 5–10 s.
- **Optional:** RNase A may be used to digest RNA during the procedure. RNase A is not provided in the DNeasy Blood & Tissue Kit (see “Copurification of RNA”, page 20).

Things to do before starting

- Buffer ATL and Buffer AL may form precipitates upon storage. If necessary, warm to 56°C until the precipitates have fully dissolved.
- Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- Preheat a thermomixer, shaking water bath or rocking platform to 56°C for use in step 2. If using frozen tissue, equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Avoid repeated thawing and freezing of samples, because this will lead to reduced DNA size.

Procedure

1. Cut up to 25 mg tissue (up to 10 mg spleen) into small pieces, and place in a 1.5 ml microcentrifuge tube. For rodent tails, place one (rat) or two (mouse) 0.4–0.6 cm lengths of tail into a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 180 µl Buffer ATL. Earmark the animal appropriately.

Ensure that the correct amount of starting material is used (see “Starting amounts of samples”, page 15). For tissues, such as spleen, with a very high number of cells for a given mass of tissue, no more than 10 mg starting material should be used.

We strongly recommend cutting the tissue into small pieces to enable more efficient lysis. If desired, lysis time can be reduced by grinding the sample in liquid nitrogen* before addition of Buffer ATL and Proteinase K. Alternatively, tissue samples can be effectively disrupted before Proteinase K digestion using a rotor–stator homogenizer, such as the TissueRuptor II, or a bead mill, such as the TissueLyser II (see ordering information starting on page 59). A supplementary protocol for simultaneous disruption of up to 48 tissue samples using the TissueLyser II can be obtained by contacting QIAGEN Technical Services (see back cover). For rodent tails, a maximum of 1.2 cm (mouse) or 0.6 cm (rat) tail should be used. When purifying DNA from the tail of an adult mouse or rat, it is recommended to use only 0.4–0.6 cm.

2. Add 20 µl Proteinase K. Mix thoroughly by vortexing, and incubate at 56°C until the tissue is completely lysed. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample or place in a thermomixer, shaking water bath or on a rocking platform.

Lysis time varies depending on the type of tissue processed. Lysis is usually complete in 1–3 h or, for rodent tails, 6–8 h. If it is more convenient, samples can be lysed overnight; this will not affect them adversely.

After incubation the lysate may appear viscous, but should not be gelatinous as it may clog the DNeasy Mini spin column. If the lysate appears very gelatinous, see the “Troubleshooting Guide”, page 52, for recommendations.

* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 4 μ l RNase A (100 mg/ml), mix by vortexing, and incubate for 2 min at room temperature (15–25°C) before continuing with step 3.

Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA, which will copurify with genomic DNA. For tissues that contain low levels of RNA, such as rodent tails, or, if residual RNA is not a concern, RNase A digestion is not necessary.

3. Vortex for 15 s. Add 200 μ l Buffer AL to the sample, and mix thoroughly by vortexing. Then add 200 μ l ethanol (96–100%), and mix again thoroughly by vortexing.

It is essential that the sample, Buffer AL, and ethanol are mixed immediately and thoroughly by vortexing or pipetting to yield a homogeneous solution. Buffer AL and ethanol can be premixed and added together in one step to save time when processing multiple samples.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL and ethanol. This precipitate does not interfere with the DNeasy procedure. Some tissue types (e.g., spleen, lung) may form a gelatinous lysate after addition of Buffer AL and ethanol. In this case, vigorously shaking or vortexing the preparation is recommended.

4. Pipet the mixture from step 3 (including any precipitate) into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (provided). Centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.*
5. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μ l Buffer AW1, and centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Discard flow-through and collection tube.*

* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

-
6. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μ l Buffer AW2, and centrifuge for 3 min at 20,000 $\times g$ (14,000 rpm) to dry the DNeasy membrane. Discard flow-through and collection tube.

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini spin column, since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This centrifugation step ensures that no residual ethanol will be carried over during the following elution.

Following the centrifugation step, remove the DNeasy Mini spin column carefully so that the column does not come into contact with the flow-through, since this will result in carryover of ethanol. If carryover of ethanol occurs, empty the collection tube, then reuse it in another centrifugation for 1 min at 20,000 $\times g$ (14,000rpm).

7. Place the DNeasy Mini spin column in a clean 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not provided), and pipet 200 μ l Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) to elute.

Elution with 100 μ l (instead of 200 μ l) increases the final DNA concentration in the eluate, but also decreases the overall DNA yield (see Figure 2, page 23).

8. **Recommended:** For maximum DNA yield, repeat elution once as described in step 7.

This step leads to increased overall DNA yield.

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, to combine the eluates, the microcentrifuge tube from step 7 can be reused for the second elution step.

Note: Do not elute more than 200 μ l into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy Mini spin column will come into contact with the eluate.

Vedlegg 6. Vedlegget viser risikovurderingen som ble laget i forbindelse med bacheloroppgaven. Risikovurderingen tok hensyn til eventuelle skader som kunne oppstå, konsekvenser av disse og hvordan de kunne forebygges.

RISIKOANALYSE (alternativ til bruk av RiskManager)										
Enhet/Institutt:		Institutt for biologiske fag, Ålesund				Dato opprettet:		10.02.2024		
Ansvarlig linjeleder (navn):		Ann-Kristin Tveten				Sist revidert:		14.05.2024		
Ansvarlig for aktiviteten som risikovurderes (navn):		Anne Elin Varhaugvik								
Deltakere (navn):		Hannah Bruteig Espeland, Ingrid Nordtømme, Evy Renate Berge-Aam og Martine Villemo Ø. Ingebrigtsen								
Beskrivelse av den aktuelle aktiviteten, området mv.:										
Risikoanalysen omfatter studentenes praktiske arbeidsområder										
Aktivitet/arbeidsoppgave	Mulig uønsket hendelse	Eksisterende risikoreducerende tiltak	Vurdering av sannsynlighet (S)	Vurdering av konsekvens (K)				Risikoverdi (S x K)	Forslag til forebyggende og/eller korrigerende tiltak Prioriter tiltak som kan forhindre at hendelsen inntreffer (sannsynlighetsreducerende tiltak) foran skjerpet beredskap (konsekvensreducerende tiltak)	Restrisiko etter tiltak (S x K)
			(1-5)	Menneske (1-5)	Øk/materiell (1-5)	Ytre miljø (1-5)	Omdomme (1-5)			
Søl eller inhalasjon av kjemikalier (xylene, formalin, fargeløsninger)	Øyeskade pga sprut mot øyet, etsende skader, inhalasjonsskader, ødeleggelse av personlige eiendeler	Vernebriller er alltid tilgjengelig i verkstedet, labfrakk og hansker tilgjengelig, kunnskap om prosedyrer og sikkerhetsdatablad	3	3				9	Før oppstart: Lese gjennom sikkerhetsdatablad og prosedyrer for HMS på laboratoriet	3
Alvorlige kuttskader	Permanente skader. Dype kutt kan oppstå ved bruk av mikrotom og skalpeller.	Korrekt bruk av utstyr. Husk at utstyr, blokker og prøvemateriale kan erstattes, men det kan ikke en finger.	2	3				6	Korrekt bruk av utstyr, god HMS, ha på sikkerhetsklemmen på mikrotomet når man skal, kjenne egne begrensninger. Legge fra seg utstyret dersom man begynner å kjenne seg sliten eller det oppstår problemer med snittet og kuttingen.	3
Prøvemateriale	Ødelegger prøvemateriale, går tom for prøvemateriale	Være sparsommelige, bytte kniv ved behov, bruke is dersom det er behov for å kjøle ned blokkene.	3		1			3	Være sparsomme og helt sikre når vi snitter, kjenne egne begrensninger, bytte kniv ofte for å ta vare på prøvematerialet, øve godt på annet materiale først	1
Besvimelse	En av oss besvimer (enten ved syn av blod, skade, inhalasjon av kjemikalier og liknende)	At ingen er alene på lab. Dersom man begynner å kjenne seg svimmel kan man legge seg ned med beina i været, samt få en kald klut i pannen. Tilby vann og hyppig tilsyn.	1	2				2	At ingen er alene på lab. Dersom man begynner å kjenne seg svimmel kan man legge seg ned med beina i været, samt få en kald klut i pannen. Tilby vann og hyppig tilsyn.	2
Blødning	Søler blod på vevsbit eller utstyr	Være forsiktige med skarpe gjenstander, ha plaster tilgjengelig, legge skarpe gjenstander unna arbeidssonen.	2		1			2	Legge skarpe gjenstander unna arbeidssonen. Passe på at ingen er alene på lab.	1
Korrekt bruk av avtrekkskap	Øyeskade pga sprut mot øyet, etsende skader, inhalasjonsskader, ødeleggelse av personlige eiendeler	Holde avtrekkskapet nede ved bruk. Ikke flytte kjemikalier, objektglass som står til tørk, tørkepapir med kjemikalier osv. ut av avtrekkskap før det er trygt	3	3				9	Før oppstart: Lese gjennom sikkerhetsdatablad og prosedyrer for HMS på laboratoriet. Passe på å bruke avtrekkskapet på sikker måte. Lukk avtrekkskapet dersom man ser at noen har glemt å gjøre det.	3
Forsøpling/dårlig merking av risikoavfall og opprydning	At noen inhalerer farlige kjemikalier eller skader seg på utstyr som ikke er ryddet bort	God merking av farlig avfall (dato, at det er til fordampning og ansvarlig), og at dette ikke forlater avtrekkskapet der det er aktuelt. Alt av skarpe gjenstander ryddes bort fra arbeidsbenken. Alt av farlig avfall skal i egnet avfallsbøtte (gul).	3	2				6	Alt av utstyr som inneholder farlige kjemikalier og som skal til fordampning må merkes godt, og ryddes unna i avtrekkskapet, slik at det ikke er i veien for andre. Det samme gjelder skarpt og farlig utstyr, samt kjemikalier. Det kan også være lurt med en god dialog mtp hvor lenge utstyret skal ligge til fordampning.	2
Korrekt bruk av mikroskop	Mikroskop blir ødelagt	Kjenner egne begrensninger. Får god opplæring og følger denne opplæringen.	1		3			3	Kjenner egne begrensninger. Får god opplæring og følger denne opplæringen. Ved problemer: hent ansvarlig veileder	3

Vedlegg 7. Vedlegget viser KI-skjemaet som ble fylt ut. KI-skjemaet er en egenerklæring på at KI ikke har blitt benyttet i utformingen eller skrivningen av denne bachelor-oppgaven.



Fakultet for naturvitenskap

Deklarasjon om KI-hjelpemidler

Har det i utarbeidingen av denne rapporten blitt anvendt KI-baserte hjelpemidler?

Nei

Ja

Hvis ja: spesifiser type av verktøy og bruksområde under.

Tekst

Stavekontroll. Er deler av teksten kontrollert av:
Grammarly, Ginger, Grammarbot, LanguageTool, ProWritingAid, Sapling, Trinkai.ai eller lignende verktøy?

Tekstgenerering. Er deler av teksten generert av:
ChatGPT, GrammarlyGO, CopyAI, WordAI, WriteSonic, Jasper, Simplified, Rytr eller lignende verktøy?

Skriveassistanse. Er en eller flere av ideene eller fremgangsmåtene i oppgaven foreslått av:
ChatGPT, Google Bard, Bing chat, YouChat eller lignende verktøy?

Hvis ja til anvendelse av et tekstverktøy - spesifiser bruken her:

Kode og algoritmer

Programmeringsassistanse. Er deler av koden/algoritmene som i) fremtrer direkte i rapporten eller ii) har blitt anvendt for produksjon av resultater slik som figurer, tabeller eller tallverdier blitt generert av: *GitHub Copilot, CodeGPT, Google Codey/Studio Bot, Replit Ghostwriter, Amazon CodeWhisperer, GPT Engineer, ChatGPT, Google Bard* eller lignende verktøy?

Hvis ja til anvendelse av et programmeringsverktøy - spesifiser bruken her:

Bilder og figurer

Bildegenerering. Er ett eller flere av bildene/figurene i rapporten blitt generert av:
Midjourney, Jasper, WriteSonic, Stability AI, Dall-E eller lignende verktøy?

Hvis ja til anvendelse av et bildeverktøy - spesifiser bruken her:

Andre KI verktøy. har andre typer av verktøy blitt anvendt? Hvis ja spesifiser bruken her:

Jeg er kjent med NTNUs regelverk: *Det er ikke tillatt å generere besvarelse ved hjelp av kunstig intelligens og levere den helt eller delvis som egen besvarelse.* Jeg har derfor redegjort for all anvendelse av kunstig intelligens enten i) direkte i rapporten eller ii) i dette skjemaet.

Martine Villemo O. Ingebrigtsen
Hannah Bruteig Espeland

Emy Renate Berge Aune
Underskrift/Dato/Sted
08.05.24, Ålesund

Ingrid Nordtømme

