

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**VARNOST IN UČINKOVITOST METRONOMSKE KEMOTERAPIJE S
CIKLOFOSFAMIDOM ZA ZDRAVLJENJE RAZLIČNIH VRST RAKAVIH
OBOLENJ PSOV**

**SAFETY AND EFFECTIVENESS OF METRONOMIC CHEMOTHERAPY WITH
CYCLOPHOSPHAMIDE FOR THE TREATMENT OF CANINE TUMOURS**

Urška Bergant Bertoncelj in Eva Župec

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 636.7.09:616-006:615.277.3(043.2)

**VARNOST IN UČINKOVITOST METRONOMSKE KEMOTERAPIJE S
CIKLOFOSFAMIDOM ZA ZDRAVLJENJE RAZLIČNIH VRST RAKAVIH
OBOLENJ PSOV**

**SAFETY AND EFFECTIVENESS OF METRONOMIC CHEMOTHERAPY WITH
CYCLOPHOSPHAMIDE FOR THE TREATMENT OF CANINE TUMOURS**

Urška Bergant Bertoncelj in Eva Župec

Delo je bilo pripravljeno v skladu s pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom prof. dr. Nataše Tozon, dr. vet. med., spec. med. psov in mačk in somentorstvom doc. dr. Tanje Švara, dr. vet. med., spec. vet. patol., na Kliniki za male živali in Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2020

POVZETEK

Ključne besede: Bolezni psov – terapija z zdravili; neoplazme – patologija – terapija z zdravili; metronomski vnos; ciklofosfamid – terapevtska raba – škodljivi učinki; izid zdravljenja; psi

Namen raziskovalne naloge je bil preučiti varnost in učinkovitost uporabe metronomske kemoterapije s ciklofosfamidom pri psih z različnimi rakavimi obolenji. V klinično raziskavo je bilo vključenih 39 psov, starih od 4,5 do 14,5 let (srednja vrednost 9,9 let). Zdravljene pse smo glede na vrsto tumorja razdelili v tri skupine: pse z mezenhimskimi, epitelnimi in oralnimi tumorji. Velikost tumorjev je znašala od 1,77 do 408,68 cm³ (srednja vrednost 67,03 cm³). Pri vseh psih smo opravili hematološke preiskave, osnovne koagulacijske parametre in analizo biokemičnih parametrov v serumu. Za določitev kliničnega stadija bolezni smo glede na tip tumorja opravili rentgensko slikanje (12/39, 31 %), ultrazvok (10/39, 26 %) in računalniško tomografijo (11/39, 28 %). Poleg terapije s ciklofosfamidom so vključeni psi prejemali tudi nesteroidna protivnetra zdravila (18/39, 46 %), pri 3 psih pa smo predpisali kortikosteroide (3/39, 8 %). Z imunohistokemično metodo smo v 10 vzorcih tumorjev preverili izražanje vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja (VEGF) in gostoto malih krvnih žil. Kot posledica napredovale bolezni je bilo evtanaziranih in posledično izključenih iz raziskave 14/39 (36 %) psov. Povprečen čas zdravljenja je bil 191 ± 97 dni, čas opazovanja pa 317 ± 192 dni. Pri 6/39 (15 %) psih se je kot neželeni stranski učinek razvil sterilni hemoragični cistitis (SHC), v povprečju po 129 dneh terapije. Ostalih neželenih učinkov nismo zaznali. Daljšo povprečno dobo preživetja smo dosegli pri nižji gostoti malih krvnih žil in pri nižjem izražanju VEGF, kjer je ta bila povprečno 561,25 dni. Povprečna doba preživetja pri višji gostoti malih krvnih žil in višjem izražanju VEGF je bila 337 dni. Rezultati kažejo, da je metronomska kemoterapija bolj varna v primerjavi s standardno kemoterapijo, saj smo le pri 15 % psih kot edini stranski učinek zaznali prehodni sterilni hemoragični cistitis in učinkovita, saj smo v 52 % primerih dosegli objektivni odgovor, vsaj stabilno bolezen.

ABSTRACT

Key words: Dog diseases – drug therapy; neoplasms – pathology – drug therapy; administration, metronomic; cyclophosphamide – therapeutic use – adverse effects; treatment outcome; dogs

The purpose of the study was to evaluate safety and efficacy of the metronomic chemotherapy with cyclophosphamide in dogs with various oncological diseases. The clinical study included 39 dogs, ranging in age from 4.5 to 14.5 years (mean 9.9 years). The observed tumours in treated dogs were divided into three groups: mesenchymal, epithelial and oral tumours. The tumour size ranged from 1.77 to 408.68 cm³ (mean 67.03 cm³). Haematological analyses, basic coagulation tests and biochemical analysis of serum were performed. Depending on the type of the tumour X-ray (12/39, 31%), ultrasound (10/39, 26%) and computed tomography (11/39, 28%) were performed to determine the clinical stage of disease. Besides the cyclophosphamide therapy, some patients were prescribed nonsteroidal anti-inflammatory drugs (18/39, 46%), and three dogs received corticosteroids (3/39, 8%). The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density were evaluated by immunohistochemical expression of 10 tumours. Due to progressive disease 14/39 (36%) dogs were euthanized and consequently excluded from the study. The mean time of treatment was 191 ± 97 days while the observation time was 317 ± 192 days. The only observed side effect was sterile hemorrhagic cystitis (SHC), which occurred in 15% cases (6/39), on average 129 days after the beginning of treatment. No other side effects were noted. Longer median survival period was observed at lower microvessel density and lower VEGF expression, where it was 561.25 days. Mean survival time at higher microvessel density and higher VEGF expression was 337 day. The results show that metronomic chemotherapy is safer compared to standard chemotherapy, because the only noted side effect was transitional sterile hemorrhagic cystitis in 15% dogs and is efficient as we achieved objective response, at least stable disease, in 52% cases.

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AC	adenokarcinom
bFGF	osnovni fibroblastni rastni faktor; <i>ang.</i> basic fibroblast growth factor
CEC	krožče endotelijске celice; <i>ang.</i> circulating endothelial cells
CEPC	krožče endotelijске progenitorne celice; <i>ang.</i> circulating endothelial progenitor cells
CD4+	označevalec pripadnosti 4; <i>ang.</i> cluster of differentiaton 4
CD25+	označevalec pripadnosti 25; <i>ang.</i> cluster of differentiaton 25
COX	ciklooksigenaza; <i>ang.</i> cyclooxygenase
CR	popolni odziv; <i>ang.</i> complete response
CSC	tumorske matične celice; <i>ang.</i> cancer stem cells
CT	računalniška tomografija; <i>ang.</i> computed tomography
DNA	deoksiribonukleinska kislina; <i>ang.</i> deoxyribonucleic acid
ECT/GET	elektrokemoterapija z genskim elektroprenosom; <i>ang.</i> electrochemotherapy with gene electrotransfer
FSA	fibrosarkom
HIF-1 α	ob hipoksiji inducirani faktor 1 α ; <i>ang.</i> hypoxia-inducible factor 1 α
IL-2	interlevkin 2
IL-10	interlevkin 10
IFN- γ	interferon gama
MK	metronomska kemoterapija
MKT	mastocitom; <i>ang.</i> mast cell tumour
MDSC	mieloidne supresorske celice, <i>ang.</i> myeloid-derived suppressor cells
MPNST	maligni tumor perifernih živčnih ovojnici; <i>ang.</i> malignant peripheral nerve sheath tumor
NSAID	nesteroidna protivnetna zdravila; <i>ang.</i> nonsteroidal anti-inflammatory drugs
OM	oralni melanom
PBS	puferirana fiziološka raztopina; <i>ang.</i> phosphate buffer saline
PD	napredovala bolezen; <i>ang.</i> progressive disease

PDGF	trombocitni rastni faktor; <i>ang.</i> platelet derived growth factor
PR	delni odziv; <i>ang.</i> partial response
RECIST	kriteriji RECIST; <i>ang.</i> response evaluation criteria in solid tumours
SCC	ploščatocelični karcinom; <i>ang.</i> squamous cell carcinoma
SD	stabilna bolezen; <i>ang.</i> stable disease
SHC	sterilni hemoragični cistitis
TGF-β	transformirajoči rastni faktor β; <i>ang.</i> transforming growth factor β
Treg	regulatorni limfocit T; <i>ang.</i> regulatory T lymphocyte
TSP-1	trombospondin 1; <i>ang.</i> thrombospondin 1
VEGF	vaskularni endotelijski rastni faktor; <i>ang.</i> vascular endothelial growth factor
VF UL	Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani
VWF	von Willebrandov faktor, <i>ang.</i> von Willebrand factor

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	II
ABSTRACT.....	III
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	IV
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO TABEL	IX
1 UVOD.....	10
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	10
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	11
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	11
2 PREGLED LITERATURE.....	13
2.1 METRONOMSKA KEMOTERAPIJA S CIKLOFOSFAMIDOM.....	13
2.2 MEHANIZMI DELOVANJA METRONOMSKE KEMOTERAPIJE	14
2.2.1 <i>Vpliv metronomske kemoterapije na angiogenezo tumorjev.....</i>	15
2.2.1.1 Tumorska angiogeneza in vaskulogeneza	15
2.2.1.2 Mehanizmi antiangiogenega zdravljenja.....	16
2.2.1.3 Antiangiogeno delovanje metronomske kemoterapije v primerjavi s standardno kemoterapijo	17
2.2.1.4 Antangiogeni mehanizmi metronomske kemoterapije	17
2.2.1.5 Biološki označevalci za spremljanje antiangiogenega učinka metronomske kemoterapije.....	18
2.2.2 <i>Vpliv metronomske kemoterapije na imunski sistem.....</i>	19
2.2.3 <i>Vpliv metronomske kemoterapije na tumorske celice in tumorske matične celice</i>	20
2.2.4 <i>Vpliv metronomske kemoterapije na mirovanje tumorja.....</i>	21
2.3 METRONOMSKA KEMOTERAPIJA V KLINIČNI PRAKSI.....	21
2.3.1 <i>Klinična uporaba metronomske kemoterapije.....</i>	21
2.3.2 <i>Neželeni stranski učinki metronomske kemoterapije.....</i>	22
2.3.3 <i>Odziv izbranih tumorjev na zdravljenje z metronomsko kemoterapijo.....</i>	24
2.3.4 <i>Sočasna uporaba drugih zdravil z metronomsko kemoterapijo</i>	26
3 MATERIALI IN METODE.....	27
3.1 KRITERIJI ZA VKLJUČITEV V RAZISKAVO.....	27
3.2 KLINIČNI PREGLED Z DOLOČANJEM KLINIČNEGA STADIJA BOLEZNI	27
3.3 ANALIZA IZBRANIH LABORATORIJSKIH PARAMETROV	28
3.3.1 <i>Laboratorijske preiskave krvnih vzorcev.....</i>	29
3.4 OBDELAVA VZORCEV TUMORJEV ZA CITOLOŠKO PREISKAVO	29
3.5 OBDELAVA VZORCEV TUMORJEV ZA HISTOPATOLOŠKO IN IMUNOHISTOKEMIČNO PREISKAVO	30
3.5.1 <i>Barvanje s hematoksilinom in eozinom.....</i>	30
3.5.1.1 Postopek barvanja s hematoksilinom in eozinom	30
3.5.2 <i>Imunohistokemično označevanje: postopek, pozitivne in negativne kontrole</i>	31
3.5.2.1 Postopek imunohistokemičnega označevanja.....	31
3.5.2.2 Pozitivne in negativne kontrole pri imunohistokemičnem označevanju	32
3.5.3 <i>Merila za ocenjevanje imunohistokemične reakcije na VEGF in določitev gostote malih krvnih žil</i>	33
3.6 STATISTIČNE METODE.....	34
4 REZULTATI.....	35
4.1 PODATKI O ŽIVALIH	35

4.2 REZULTATI KLINIČNE RAZISKAVE.....	37
4.2.1 <i>Podatki o diagnosticiranih tumorjih.....</i>	37
4.2.2 <i>Odmerjanje in klinični način zdravljenja</i>	37
4.2.3 <i>Povprečen čas zdravljenja in čas opazovanja</i>	37
4.2.4 <i>Stranski učinki.....</i>	38
4.2.5 <i>Uspešnost metronomske kemoterapije pri psih z različnimi tipi tumorjev</i>	42
4.2.5.1 Psi, izključeni iz raziskave.....	42
4.2.5.2 Rezultati metronomske kemoterapije psov z mezenhimskimi tumorji	43
4.2.5.3 Rezultati metronomske kemoterapije psov z epitelnimi tumorji.....	46
4.2.5.4 Rezultati metronomske kemoterapije psov z oralnimi tumorji	48
4.3 IMUНОHISTОKЕMIČНА PREISKAVA.....	53
4.3.1 <i>Izražanje VEGF.....</i>	53
4.3.2 <i>Gostota malih krvnih žil.....</i>	57
5 RAZPRAVA.....	60
5.1 VARNOST METRONOMSKE KEMOTERAPIJE	61
5.2 ODGOVOR NA ZDRAVLJENJE Z METRONOMSKO KEMOTERAPIJO IN DOBA PREŽIVETJA PRI PSIH Z RAZLIČNIMI SPONTANIMI TUMORJI	62
5.3 VPLIV IZRAŽANJA VEGF IN GOSTOTE MALIH KRVNIH ŽIL NA ODZIV NA ZDRAVLJENJE IN DOBO PREŽIVETJA	64
6 SKLEPI.....	66
7 ZAHVALA.....	67
8 LITERATURA.....	68
9 PRILOGE	74

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Pes št. 2 z mehkotkvivnim sarkomom (puščica) na smrčku.</i>	44
<i>Slika 2: Pes št. 12 z nevprofibrosarkomom (puščica) na sprednji nogi.</i>	44
<i>Slika 3: Pes št. 3 z mehkotkvivnim sarkomom (puščica) na zadnji nogi.</i>	45
<i>Slika 4: Pes št. 28 z difuznim karcinomom pljuč.</i>	47
<i>Slika 5: Pes št. 30 s tonsilarnim ploščatoceličnim karcinomom (puščica).</i>	49
<i>Slika 6: Pes št. 39 z oralnim ploščatoceličnim karcinomom (puščica).</i>	50
<i>Slika 7: Pes št. 33 z oralnim fibrosarkomom (puščica).</i>	51
<i>Slika 8: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse glede na skupino tumorjev</i>	52
<i>Slika 9: Ravni izražanja vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja glede na imunohistokemično označevanje.</i>	54
<i>Slika 10: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse glede na seštevek ravni izražanja VEGF in jakosti imunohistokemične reakcije</i>	56
<i>Slika 11: Imunohistokemično označevanje krvnih žil s protitelesom proti von Willebrandovemu faktorju.</i>	58
<i>Slika 12: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse glede na gostoto malih krvnih žil</i>	59

KAZALO TABEL

<i>Tabela 1: Rezultati objavljenih raziskav</i>	24
<i>Tabela 2: Podatki o psih, vključenih v raziskavo o metronomski kemoterapiji</i>	35
<i>Tabela 3: Podatki o psih z mezenhimskimi tumorji</i>	39
<i>Tabela 4: Podatki o psih z epitelnimi tumorji</i>	40
<i>Tabela 5: Podatki o psih z oralnimi tumorji</i>	41
<i>Tabela 6: Podatki o psih, izključenih iz raziskave</i>	42
<i>Tabela 7: Podatki o zdravljenju psov z mezenhimskimi tumorji</i>	43
<i>Tabela 8: Podatki o zdravljenju psov z epitelnimi tumorji</i>	46
<i>Tabela 9: Podatki o zdravljenju psov z oralnimi tumorji</i>	48
<i>Tabela 10: Izražanje VEGF v povezavi z oceno po kriteriju RECIST</i>	55
<i>Tabela 11: Rezultati meritev gostote malih krvnih žil</i>	57

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Rakava obolenja so eden najpogostejših vzrokov pogina domačih ljubljenčkov. Njihova pojavnost se vsako leto viša. Zaradi izboljšanja življenjskih pogojev hišnih živali in dostopnejših možnosti diagnostičnih postopkov v veterinarski medicini se je podaljšala njihova življenjska doba ter posledično zvišala možnost razvoja tumorjev. Z vse večjo izobraženostjo lastnikov in medijsko odmevnostjo se veča tudi povpraševanje po razvoju novih učinkovitih načinov zdravljenja rakavih obolenj. Standardna kemoterapija temelji na ponovitvah največjih odmerkov, ki so za zdravljenega psa še dopustni brez prekomernih stranskih učinkov (1). Delitev endotelijskih celic in s tem rast rakavega ožilja je med ponovitvami hitra, kar omogoča tumorju preživetje (2). Zaradi izrazite angiogene sposobnosti nekaterih tumorjev so razvili način zdravljenja, ki se osredotoča na zaviranje rasti tumorskega ožilja (3).

Metronomska kemoterapija (*ang. metronomic chemotherapy*) se je izkazala kot potencialno uspešen način zdravljenja rakavih obolenj. Zdravljenje poteka s peroralno aplikacijo citostatika ciklofosfamida ali drugih učinkovin v manjših odmerkih dlje časa, brez daljših obdobjij prekinitev zdravljenja (3). Metronomska kemoterapija zmanjša nastajanje novih krvnih žil v tumorju. V preteklosti se je uporabljala kot zadnja možnost zdravljenja, ko drugi načini niso bili več primerni (3). V zadnjem času pa se uporablja tako kot terapija prvega izbora (4, 5), kot tudi dopolnilna terapija standardni kemoterapiji, obsevanju ali kirurškem zdravljenju (4) ter kot vzdrževalna terapija po zaključku standardne kemoterapije (5).

Do sedaj je bilo objavljenih 20 kliničnih raziskav o uporabi metronomske kemoterapije. V 5 primerih so predstavili posamezne klinične primere, v 15 raziskavah (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) pa je bilo vključeno večje število psov. V literaturi je malo podatkov o varnosti in učinkovitosti metronomske kemoterapije, zato so za natančno opredelitev indikacij in uveljavitev v veterinarski onkologiji potrebne nadaljnje raziskave (3).

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Namen raziskovalne naloge je bil preveriti varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije s ciklofosfamidom za zdravljenje različnih vrst tumorjev pri psih.

V klinično študijo smo vključili pse z različnimi tumorji, diagnosticiranimi s citološko in/ali histopatološko preiskavo. Pred začetkom zdravljenja smo opravili klinični pregled z določanjem kliničnega stadija bolezni in opravili analizo izbranih laboratorijskih parametrov (krvna slika z diferencialno belo krvno sliko, izbrani biokemični parametri v krvnem serumu in koagulacijski parametri). Zdravljenje pse smo nato spremajali mesečno, pri čemer smo ocenjevali lokalni in sistemski odziv na zdravljenje na osnovi preverjanja lokalnega odziva, kliničnega stadija bolezni in sprememb izbranih laboratorijskih parametrov. Neželene stranske učinke smo spremajali po veljavnih kriterijih Veterinary Cooperative Oncology Group (10).

Čeprav je znano, da metronomska kemoterapija deluje imunomodulatorno, smo zaradi omejenih sredstev v nalogi na vzorcih tumorjev pred zdravljenjem preverili le imunohistokemično izražanje vaskularnega endoteljskega rastnega faktorja (VEGF, *ang. vascular endothelial growth factor*) in gostoto malih krvnih žil (*ang. microvessel density*), z namenom ocenitve, ali izražanje VEGF in gostota malih krvnih žil vplivata na objektivni odziv rakave bolezni na zdravljenje z metronomsko kemoterapijo s ciklofosfamidom.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Metronomska kemoterapija s ciklofosfamidom samostojno, kot tudi v kombinaciji s piroksikamom/meloksikamom ali metilprednizolonom je varna in pri zdravljenih psih ne povzroča klinično pomembnih neželenih stranskih učinkov.
- Z metronomsko kemoterapijo s ciklofosfamidom v odmerku nad $12,5 \text{ mg/m}^2/24 \text{ ur}$ najmanj 6 mesecev dosežemo objektivni odgovor na zdravljenje, vsaj stabilizacijo bolezni ter statistično značilno podaljšamo dobo preživetja pri različnih vrstah rakavih obolenj pri psih v primerjavi z nezdravljenimi psi.

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

- Zaradi antiangiogenega delovanja ciklofosfamida in piroksikama je učinkovitost metronomske kemoterapije odvisna od stopnje izražanja VEGF in gostote malih krvnih žil.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 METRONOMSKA KEMOTERAPIJA S CIKLOFOSFAMIDOM

Metronomsko kemoterapijo definiramo kot peroralno prejemanje kemoterapevtika z relativno nizkimi, minimalno toksičnimi odmerek, dlje časa, brez obdobjij prekinitev (3).

Pri standardni kemoterapiji uporabljamo najvišji odmerek, ki ga živali tolerirajo in, ki deluje na hitro delečo populacijo rakavih celic, kateremu sledi obdobje prekinitev z namenom obnovitve kritičnih normalnih celičnih populacij. Ker pride tudi do uničenja hitro delečih celic kostnega mozga in gastrointestinalnega sistema, je prekinitev med aplikacijami zdravila nujna za preprečitev resnih neželenih stranskih učinkov. Vendar pa prekinitev omogočajo tudi delitev rakavih celic, kar lahko privede do ponovne rasti tumorja, razvoja odpornosti proti zdravilu ali do metastatske bolezni (2).

Metronomska kemoterapija za razliko od standardne kemoterapije pomeni neprekinjeno izpostavljenost kemoterapevtikom skozi daljše časovno obdobje, pri čemer uporabimo bistveno nižji odmerek, kar zmanjša možnost pojave neželenih stranskih učinkov. Poleg tega, da jo živali dobro prenašajo je metronomska kemoterapija v veterinarski onkologiji privlačna, saj so neželeni stranski učinki in s tem potreba po podpornih zdravilih redki, prav tako pa jo lahko kombiniramo z drugimi zdravili. Ker zdravljenje poteka v domačem okolju, s peroralnim vnosom, je zdravljenje relativno nezahtevno za lastnika in manj stresno za psa (1).

Pri odločitvi za metronomski režim zdravljenja se moramo zavedati, da je cilj stabilizacija rasti tumorja in ne znatno zmanjšanje velikosti tumorja kot pri standardni kemoterapiji. Stabilizacija rasti tumorja mora psu zagotavljati kakovostno življenje (2).

2.2 MEHANIZMI DELOVANJA METRONOMSKE KEMOTERAPIJE

Metronomska kemoterapija je terapija, ki cilja več tarč (2). Najpomembnejše mehanizme delovanja lahko trenutno razdelimo v štiri glavne skupine: antiangiogeni učinek, učinek na imunski sistem, na tumorske celice in tumorske matične celice ter s tem sprožitev mirovanja rasti tumorja (3). Nekatere raziskave potrjujejo tudi sinergistični učinek z nesteroidnimi protivnetnimi zdravili (NSAID, *ang.* nonsteroidal anti-inflammatory drugs) in inhibitorji tirozin kinaz (2, 21).

Ciklofosfamid, alkilirajoči cistostatik, ki se pri metronomski kemoterapiji najpogosteje uporablja, ima močno antiangiogeno in imunomodulatorno sposobnost. Za doseganje protitumorskega učinka se mora metabolizirati v aktivne derivate. Najpomembnejša sta 4-hidroksi-ciklofosfamid in akrolein. Z *in vitro* poskusi so dokazali, da je od koncentracije 4-hidroksi-ciklofosfamida odvisno delovanje na različne tipe celic. Endotelijske celice so bolj občutljive na nižje odmerke, fibroblasti in tumorske celice pa na višje odmerke zdravila. 4-hidroksi-ciklofosfamid v nizki koncentraciji sproži apoptozo endotelijskih celic in regulira trombospondin-1 (TSP-1, *ang.* thrombospondin 1). Akrolein pa deluje protitumorsko preko sprememb citoskeleta rakavih celic in povečanja izražanja antiangiogenih dejavnikov. Akrolein je nefrotoksičen (22).

Odmerki zdravila se razlikujejo glede na literaturo, kjer zasledimo odmerke med 7 – 25 mg/m² na 24 ali 48 ur (3). Zadnje raziskave so pokazale, da dnevni odmerek nad 12,5 mg/m² deluje najbolj imunomodulatorno in antiangiogeno (10).

2.2.1 Vpliv metronomske kemoterapije na angiogenezo tumorjev

2.2.1.1 Tumorska angiogeneza in vaskulogeneza

Angiogeneza in vaskulogeneza sta bistveni za rast tumorja. Angiogeneza je proces nastajanja novih krvnih žil iz zrelih in hitro delečih endotelijskih celic, ki so prisotne v že obstoječih kapilarah. Zmožnost aktivacije angiogeneze, imenovano tudi angiogensko stikalo, je ključen proces napredovanja tumorja. S tvorbo lastnega ožilja si tumorsko tkivo zagotovi dotok hraničnih snovi in kisika ter odtok odpadnih snovi. Brez dotoka krvi lahko solidni tumor zraste le do velikosti nekaj milimetrov (2). Danes vemo, da angiogeneza poteka tudi v mikroskopskih predinvazivnih lezijah in ne samo v fazi hitre rasti tumorja (23).

Tumorska angiogeneza je zelo zapleten proces, ki vključuje prisotnost več dejavnikov, vključno z angiogenimi molekulami in celicami, kot so endotelijske celice, periciti in prekurzorske celice iz kostnega mozga (23). Pri procesu rasti krvnih žil sodeluje veliko število proangiogenih rastnih faktorjev in endogenih inhibitorjev angiogeneze, kar omogoča uravnoteženo rast krvnih žil (21). V rastočih tumorjih je to ravnotežje v prid spodbujanju angiogeneze (24).

Medtem ko je angiogeneza proces rasti novih iz že obstoječih krvnih žil, je vaskulogeneza proces nastajanja novih krvnih žil iz progenitornih celic iz kostnega mozga (2), ki se odzovejo na proangiogene signale. Krožeče endotelijske progenitorne celice (CEPC, *ang.* circulating endothelial progenitor cells) prispevajo k tumorski angiogenezi tako, da potujejo do mesta tumorja in se vključijo v stene že obstoječih krvnih žil. Krožeče endotelijske celice (CEC, *ang.* circulating endothelial cells) predstavljajo stranski produkt lokalne angiogeneze in ne nakazujejo na vključenost kostnega mozga (25).

Angiogensko stikalo pomeni povečano delovanje rastnih faktorjev, vključno z VEGF, osnovnim fibroblastnim rastnim faktorjem (bFGF, *ang.* basic fibroblast growth factor) in trombocitnim rastnim faktorjem (PDGF, *ang.* platelet derived growth factor). Med njimi je najpomembnejši VEGF, ki spodbuja angiogenezo z neposrednimi učinki na delitev in migracijo endotelijskih celic ter z mobilizacijo CEPC iz kostnega mozga na mesta neovaskularizacije (2).

Drugi pomemben vidik angiogenega stikala je tumorsko povzročena inhibicija naravno prisotnih antiangiogenih molekul, kot je TSP-1. TSP-1 ima neposreden zaviralen učinek na delitev in apoptozo endotelijskih celic in je zato močan antagonist VEGF (2).

2.2.1.2 Mehanizmi antiangiogenega zdravljenja

Antiangiogeni učinek lahko dosežemo preko različnih mehanizmov.

Prvi mehanizem predstavlja preprečitev rasti krvnih žil, kar je posledica zmanjšane proizvodnje proangiogenih dražljajev in povečanja delovanja antiangiogenih dražljajev (2, 5). Drugi mehanizem je uničenje krvnih žil in posledično okrnjenje dotoka hranilnih snovi in kisika, kar vodi do celičnega stradanja in hipoksije ter posledične smrti tumorskih celic (26, 27).

Proces, imenovan vaskularna normalizacija, pomeni selektivno uničenje manjših in neučinkovitih krvih žil in s tem izboljšanje celotnega krvnega pretoka skozi tumor (28) ter tudi dotoka kisika in hranilnih snovi ter tudi apliciranega kemoterapevtika (26, 27).

Najpogostejsa klinična pristopa k zaviranju angiogeneze sta inhibicija prekomerno izraženega proangiogenega dražljaja ali nadomeščanje faktorjev za inhibicijo angiogeneze (29). Namen uporabe učinkovin, ki delujejo zaviralno na proangiogene rastne faktorje, je zaustaviti ali zmanjšati rast krvnih žil, kar povzroči propad tumorskih celic (24). Potencialni način zaustavljanja vaskulogeneze je nevtralizacija CEPC (29).

Onколоško zdravljenje je že nekaj let usmerjeno proti angiogenezi, predvsem zaradi uveljavljanja zdravil, ki delujejo na proangiogeni VEGF. Zdravili, ki imata takšno antiangiogeno delovanje, sta bevacizumab, monoklonsko protitelo proti VEGF in toceranib, inhibitor tirozin kinaz (30). Zdravljenje z osredotočanjem na angiogenezo se ne uporablja samo pri solidnih tumorjih, temveč tudi pri malignih obolenjih kostnega mozga. Talidomid, zdravilo z antiangiogenimi učinki, se uporablja za zdravljenje multiplega mieloma pri ljudeh (31).

2.2.1.3 Antiangiogeno delovanje metronomske kemoterapije v primerjavi s standardno kemoterapijo

Podobno kot tumorske celice se tudi tumorske endotelijske celice delijo hitro in so kot take dovzetne za citotoksično kemoterapijo. Čeprav se morda zdi presenetljivo, so ugotovili, da imajo zdravila iz skoraj vseh razredov običajnih zdravil za kemoterapijo antiangiogeno delovanje. Ključ do povečanja antiangiogenega učinka kemoterapevtikov je zmanjšanje ali popolna odprava obdobja brez zdravil med cikli standardne kemoterapije. Namreč, ravno med obdobjem prekinitve je največja možnost popravila in repopulacije endotelijskih celic (32), za kar so odgovorne CEPC (23).

2.2.1.4 Antiangiogeni mehanizmi metronomske kemoterapije

MK s ciklofosfamidom neposredno vpliva na endotelijske celice v ožilju tumorja s selektivno indukcijo apoptoze in inhibicijo delitve in migracije (33). Med zdravljenjem z metronomsko kemoterapijo s ciklofosfamidom in morebitnimi drugimi kemoterapevtiki se pojavi povečano delovanje endogenih zaviralcev angiogeneze TSP-1 (2, 5, 34) in endostatina (2, 5). Zaviranje angiogeneze je verjetno okrepljeno z zmanjšanjem proizvodnje proangiogenih rastnih faktorjev iz tumorja, npr. VEGF, bFGF, ob hipoksiji inducirani faktor 1 α (HIF-1 α , *ang. hypoxia-inducible factor 1*) in faktorjev iz družine angiopoetina (2, 5).

Z metronomskim vnosom nekaterih citotoksičnih kemoterapevtikov lahko ciljamo tudi na druge komponente tumorskega mikrookolja (1). Tumorska angiogeneza vključuje rekrutiranje CEPC (25). Menijo, da te celice igrajo pomembno vlogo pri rasti tumorskih krvnih žil in so najbolj učinkovite v zgodnjem obdobju prekinitve prejemanja kemoterapevtika po standardnem protokolu. Predklinični modeli so pokazali, da se pri standardni kemoterapiji raven CEPC zniža, vendar se v obdobju prekinitve ponovno poviša. Nasprotno metronomska kemoterapija ni povezana s povišanjem ravni CEPC, zato lahko povzroča trajni antiangiogeni učinek (35). Metronomska kemoterapija zaustavi mobilizacijo in zmanjuje sposobnost preživetja CEPC (36) ter jih celo uniči (37).

V klinični raziskavi psov z mehkotkivnim sarkomom so s peroralno aplikacijo ciklofosfamida v odmerku 15 mg/m²/24 ur dosegli znatno zmanjšanje gostote krvnih žil tumorja v 14 dneh,

kar so preverjali s ponavlajočimi biopsijami tumorjev. Pri manjših odmerkih (10 in 12,5 mg/m²/24 ur) ni bilo sprememb v gostoti krvnih žil. V tej raziskavi niso bili ocenjeni drugi potencialni biomarkerji angiogeneze, kot so ravni izražanja VEGF in številčnost CEC (8).

Kombinirani učinki metronomske kemoterapije s ciklofosfamidom z drugimi antiangiogenimi sredstvi, kot so zaviralci ciklooksigenaze-2 (COX-2) in inhibitorji tirozin kinaz, so področje aktivnih raziskav. Blokada COX-2 in receptorjev tirozin kinaze, ki so prekomerno izraženi na številnih tumorskih celicah, namreč poruši znotrajcelično signalno kaskado, ki vodi k proizvodnji VEGF, PDGF in drugih proangiogenih faktorjev rasti. Raziskuje se tudi kombinacija metronomske kemoterapije z drugimi sredstvi, kot je bevacizumab, monoklonsko protitelo, ki se veže na VEGF, in trastuzumab, monoklonsko protitelo, ki se veže na človeške receptorje ErB-2. Preliminarne raziskave dokazujojo, da kombinacija antiangiogenih zdravil z različnimi načini lahko deluje sinergistično (2).

V raziskavi uporabe metronomske kemoterapije s ciklofosfamidom pri miših s pasjim ksenotransplantom oralnega melanoma (OM) ni vplivala na gostoto krvnih žil tumorja, razen če je bila kombinirana s piroksikamom. Ta kombinacija zdravil je zmanjšala tudi znotrajtumorsko izločanje VEGF in povečala izražanje TSP-1 (34). Raziskave tako kažejo, da kombinacija metronomske kemoterapije z NSAID lahko poveča učinkovitost zdravljenja (2).

2.2.1.5 Biološki označevalci za spremljanje antiangiogenega učinka metronomske kemoterapije

Ena največjih ovir pri uporabi zdravil v klinični praksi, kar velja tudi za metronomsko kemoterapijo, je pomanjkanje prognostičnih dejavnikov za spremljanje odziva na terapijo, za predvidevanje odziva na terapijo pri posameznem psu in za pomoč pri določanju ustreznega odmerka, pogostnosti dajanja ter trajanja zdravljenja (2). Odmerek, ki ima optimalno biološko aktivnost, je pogosto precej nižji od maksimalnega tolerantnega odmerka. VEGF je do sedaj najbolj raziskan biološki označevalec za spremljanje antiangiogenega protitumorskoga učinka (1). Najboljši biološki označevalec je tisti, ki določi odziv tumorja na terapijo, saj samo zaviranje angiogeneze ni nujno v povezavi z zmanjšanjem velikosti tumorja. Sistemi za klinično ovrednotenje odziva tumorja na terapijo, ki so zasnovani po kriterijih RECIST (*ang. response evaluation criteria in solid tumours*) Svetovne zdravstvene organizacije enačijo zmanjšanje tumorja kot pozitivni izid (5). V raziskavi, ki so jo izvedli Marchettijeva in sod., je

bila bazalna vrednost VEGF v plazmi povezana z napovedjo odziva na metronomsko kemoterapijo pri psih z zasevki različnih spontanih tumorjev (adenokarcinom mlečne žleze, pljuč in apokrinih žlez, mastocitom, oralni melanom, karcinom skorje nadledvične žleze in sarkom pljuč) (10). Preprosta primerjava ravni VEGF ali TSP-1 pred in po zdravljenju ni zanesljiva, saj antiangiogena aktivnosti ni nujno v povezavi z zmanjšanjem velikosti tumorja (2). V raziskavi, v katero so vključili 10 zdravih psov in 30 psov z različnimi tumorji, zdravljenimi z metronomskim odmerkom ciklofosfamida, navajajo, da so bile bazalne vrednosti VEGF v plazmi občutno višje pri psih s tumorji in od teh še višje pri psih z zasevki, vendar pa statistično značilnih razlik v vrednosti VEGF pred in po zdravljenju z metronomsko kemoterapijo ni bilo (9). Pri antiangiogenem zdravljenju je zato smiselno prepoznati trajno stabilno bolezen kot zaželeno končno točko kliničnega zdravljenja in sočasno spremljati biološke označevalce za oceno angiogene funkcije med zdravljenjem (39).

Zaznavanje CEC in CEPC v krvi psa z rakom lahko poleg določanja ravni VEGF služi kot eden najbolj uporabnih označevalcev angiogeneze in antiangiogenega zdravljenja (25). Pri metronomskih protokolih, ki uporablajo ciklofosfamid, je optimizacija odmerkov izvedljiva z merjenjem sprememb v številu regulatornih T limfocitov (Treg, *ang.* regulatory T lymphocytes) v obtoku. To ugotovitev je nakazala raziskava pri psih z mehkotkivnimi sarkomi, zdravljenimi z metronomsko kemoterapijo s ciklofosfamidom, pri katerih sta se število/odstotek Treg znižala z večanjem odmerka (8).

2.2.2 Vpliv metronomske kemoterapije na imunski sistem

Sposobnost tumorjev, da jih imunski sistem ne zazna, je ključna za njihovo rast. Okolje, ki daje prednost imunski supresiji namesto aktivaciji, pomaga tumorskim celicam, da se izognejo napadu citotoksičnih celic T, celic T pomagalk in naravnih celic ubijalk. Pomembno vlogo pri zaviranju protitumorskega imunskega sistema imajo Treg in mieloidne supresorske celice (MDSC, *ang.* myeloid-derived suppressor cells), dendritične celice in makrofagi (2).

Metronomsko odmerjanje ciklofosfamida je povezano z več imunomodulatornimi učinki, vključno z aktivacijo dendritičnih celic in stimulacijo citotoksičnih celic T (22).

Nizki odmerki ciklofosfamida znižujejo raven Treg z označevalcema pripadnosti CD (*ang.* cluster of differentiation) 4+ in CD25+ (40). V raziskavi na psih z mehkotkivnim sarkomom je

dajanje bodisi ciklofosfamida ($15 \text{ mg/m}^2/24 \text{ ur}$) bodisi klorambucila ($0,1 \text{ mg/kg}/24 \text{ ur}$) povzročilo zmanjšanje števila Treg v periferni krvi v primerjavi z izhodiščnimi vrednostmi. Dokazali so tudi, da je bil odstotek Treg v periferni krvi pri psih z mehkotkivnim sarkomom višji (7,6 %) kot pri zdravih psih (4,8 %) (8).

V raziskavi, v katero so vključili zdrave pse in pse z različnimi rakavimi obolenji, so prav tako dokazali, da so Treg vrednosti v plazmi pri psih z rakavim obolenjem višje kot pri zdravih psih. Pri rakavih obolenjih je poleg števila povišana tudi funkcionalnost Treg. Prav tako je v tej raziskavi odmerek ciklofosfamida $12,5 \text{ mg/m}^2/24 \text{ ur}$ znižal odstotek Treg pri zdravljenih psih (38). Nizki odmerki ciklofosfamida znižajo ravni imunosupresivnih citokinov, kot so transformirajoči rastni faktor β (TGF- β , *ang. transforming growth factor β*), interlevkin-10 (IL-10, *ang. interleukin 10*) in interlevkin-2 (IL-2, *ang. interleukin-2*) ter stimulirajo produkcijo naravnih celic ubijalk, ki izločajo interferon gama (IFN- γ , *ang. interferon gamma*) in zorenje dendritičnih celic ter ohranjajo preživetje spominskih limfocitov T (22).

2.2.3 Vpliv metronomske kemoterapije na tumorske celice in tumorske matične celice

Tumorske matične celice (CSC, *ang. cancer stem cells*) so podpopulacija tumorskih celic, ki imajo sposobnost delitve in diferenciacije v nove tumorske celice, skupaj s sistemi popravila DNA (2) in lahko sprožijo rast tumorja (5, 8). Te celice lahko proizvedejo visoke ravni VEGF v normalnih in hipoksičnih pogojih, zaradi česar imajo močno angiogeno sposobnost (41). Poleg tega so CSC glavni vzrok tumorske rezistence na standardno kemoterapijo in obsevanje zaradi različnih mehanizmov (6, 20, 24), vključno z močnim izražanjem apoptozo zavirajočih proteinov (41). Ker se pri metronomski kemoterapiji uporablajo nižji odmerki zdravila v primerjavi s standardno kemoterapijo, so predvidevali, da ta nima pomembnega neposrednega citotoksičnega učinka na tumorske celice (2). Nekateri avtorji verjamejo, da na tumorske celice vpliva neprekinjen učinek, ki ga povzroča metronomska kemoterapija (37). Kljub omejenim dokazom lahko metronomska kemoterapija povzroči prekinitev razvoja in rasti CSC preko svojih antiangiogenih učinkov na ozilje tumorja (36) in zaradi osrednjega učinka na VEGF, ki povzroča tvorbo in obnovo CSC na avtokrini način. Antiangiogena zdravljenja so lahko posredno usmerjena v zatiranje CSC. Z antiangiogenimi učinki določenega zdravila lahko posredno dosežemo smrt tumorskih celic (42).

2.2.4 Vpliv metronomske kemoterapije na mirovanje tumorja

Metronomska kemoterapija sproži stanje tumorskega mirovanja, kar vodi do dolgotrajnega nadzora nad boleznijo (43). Tumorsko mirovanje je posledica ustavitve celičnega cikla ali dinamičnega ravnovesja med proliferacijo in apoptozo rakavih celic (44, 45). Tumorsko mirovanje se lahko razvije bodisi v primarnem tumorju bodisi v njegovih zasevkih (43). Obstajajo tri vrste mirovanja: angiogeno (43), celično in imunsko posredovano mirovanje. Vsa so posledica kompleksnih interakcij med tumorskimi celicami in tumorskim mikrookoljem (46). Z neposrednim delovanjem na te oblike mirovanja na več ravneh, ki imajo medsebojni vpliv, lahko nastane aditivni ali sinergistični učinek.

2.3 METRONOMSKA KEMOTERAPIJA V KLINIČNI PRAKSI

2.3.1 Klinična uporaba metronomske kemoterapije

V veterinarski medicini se je metronomska kemoterapija v preteklosti uporabljala kot paliativno zdravljenje, ko so izčrpali druge oblike zdravljenja (3).

Danes se uporablja na sledeče načine:

1) Terapija prvega izbora

Pri bolnikih z napredovalim in/ali neozdravlјivim stanjem se zaradi toksičnosti standardnega pristopa metronomska kemoterapija uporablja kot terapija prvega izbora (4, 5).

2) Dopolnilna terapija

Metronomska kemoterapija se kot dopolnilna terapija uporablja pri psih z velikim tveganjem ponovitve po adjuvantni ali neoadjuvantni standardni kemoterapiji z namenom podaljšanja remisije. Uporablja se lahko tudi kot adjuvantno zdravljenje po kirurški odstranitvi in/ali obsevanju z namenom uničenja preostalih tumorskih celic ali mikrozasevkov (4).

3) Vzdrževalna terapija

Metronomska kemoterapija kot vzdrževalna terapija se uporablja pri psih po standardni kemoterapiji, ne glede na dosežen odziv, z namenom boljše kakovosti življenja, antiangiogenih učinkov in ohranjanja stanja, ki ga je dosegla standardna kemoterapija (36). Standardni in

metronomski režimi se lahko celo izmenjujejo, odvisno od kliničnega stanja zdravljenega psa in odziva na zdravljenje (3).

2.3.2 Neželeni stranski učinki metronomske kemoterapije

Neželeni stranski učinki ciklofosfamida so opisani predvsem na urinarnem in gastrointestinalnem sistemu (47), opisani so tudi učinki na krvožilni sistem (22). Najpogosteje se kot neželeni stranski učinek pri zdravljenju s ciklofosfamidom, bodisi v obliki metronomske bodisi standardne kemoterapije, pojavi sterilni hemoragični cistitis (4, 7, 48, 49). Do sterilnega hemoragičnega cistitisa privede delovanje akroleina na endotelij sečnega mehurja (47). Dajanje zdravila zjutraj in spodbujanje čim pogostejšega praznjenja mehura s ponuanjem vode zmanjša možnost pojava. Priporočljivo je spremljanje produkcije urina in po potrebi uvedba diuretikov ter periodična analiza urina (3).

V raziskavi, v katero je bilo vključenih 30 psov z mehkotkvimi sarkomi, zdravljenih z metronomsko kemoterapijo (ciklofosfamid $10 \text{ mg/m}^2/24 \text{ ur}$ in piroksikam $0,3 \text{ mg/kg}/24 \text{ ur}$), so se pri 40 % psov pojavili blagi gastrointestinalni znaki, le pri enem psu se je razvil sterilni hemoragični cistitis (20). V raziskavi, v katero je bilo vključenih 18 psov s hemangiosarkomom vranice, so pri 9 psih (50 %), zdravljenih z nizkimi odmerki ciklofosfamida in etoposidom ter piroksikamom, ugotovili nižjo gastrointestinalno toksičnost v primerjavi s psi, zdravljenimi s standardno kemoterapijo z doksorubicinom. 2 od 9 psov, zdravljenih po metronomskem režimu, sta razvila sterilni hemoragični cistitis, medtem ko tega neželenega stranskega učinka pri psih, zdravljenih s standardno kemoterapijo, ni bilo (6).

V drugi raziskavi, v katero so vključili 65 psov z različnimi tumorji, se je sterilni hemoragični cistitis pojavil pri 16 psih (25 %) in se izrazil s hematurijo in negativno mikrobiološko preiskavo, od teh so se pri 9 psih razvili klinični znaki sterilnega hemoragičnega cistitisa skupaj z disurijo, poliurijo in nokturijo. Povprečni čas od začetka zdravljenja do pojava znakov je bil 110 dni. S prekinjivjo terapije v večini primerov ni prišlo do napredovanja kliničnih znakov. Pri 12 psih (18 %) so se pojavili tudi gastrointestinalni znaki, ki so bili bolj verjetno posledica NSAID kot pa ciklofosfamida, saj so znaki izzveneli s prenehanjem dajanja NSAID. Stranskih učinkov na kostni mozeg niso zaznali v nobenem primeru. Ob pojavu toksičnih učinkov, ki so jih potrdili pri 49 % zdravljenih psov, so ocenili, da so bili ti blagi in niso imeli vpliva na kakovost življenja psov. Skoraj 25 % psov je razvilo SHC, kar je več kot v katerikoli drugi raziskavi s podobno skupino psov. Vzrok za to bi lahko bil v bolj podrobнем spremljanju psov,

pri katerih so diagnosticirali SHC, četudi niso kazali kliničnih znakov. Pri 4 psih je prišlo do bakterijske okužbe, za katero avtorji ne navajajo vstopnega mesta okužbe, so pa izključili izvor iz urinarnega sistema. Ti psi niso razvili nevtropenije, zato je možno, da so bile ugotovljene okužbe naključne (47).

V raziskavi, opravljeni na 50 psih z različnimi tumorji, so poleg zgoraj naštetih stranskih učinkov zabeležili še blago do zmerno anemijo pri 19 psih (39 %). Od teh je 9 psov imelo hemangiosarkomom, zato so bili mnenja, da je anemija povezana z napredovanjem te bolezni in ne z metronomsko kemoterapijo. Uporabljeni odmerek ciklofosfamida je bil 25 mg/m^2 vsak drugi dan. Ta naj bi predstavljal visoko tveganje za razvoj SHC, še posebej pri dolgotrajni uporabi. Visok odmerek in kombinacija z NSAID naj bi bila vzrok tudi za povišano serumsko koncentracijo kreatininina (49).

2.3.3 Odziv izbranih tumorjev na zdravljenje z metronomsko kemoterapijo

Rezultate objavljenih raziskav navajamo v Tabeli 1.

Tabela 1: Rezultati objavljenih raziskav

Table 1: Results of published studies

Št.	Avtor (številka vira)	Število psov in tip preiskovanih tumorjev	Protokol kemoterapije
1	Lana in sod. (6)	33, HSA	1. skupina: DOX (30 mg/m ² , IV), 5x, na 2 tedna, (adjuvantno) 2. skupina: CYC (12,5 - 25 mg/m ² /24 ur PO) in etoposid (50 mg/m ² /24 ur, PO) menjajoča se na 3 tedne, 6 mesecev (adjuvantno)
2	Elmslie in sod. (7)	85, STS	CYC (10 mg/m ² /24 ur PO) (adjuvantno)
3	Burton in sod. (8)	11, STS	CYC (12,5 mg/m ² /24 ur 28 dni in 15 mg/m ² /24 ur 28 dni)
4	Tripp in sod. (9)	81, različni tipi	Lomustine (60 mg/m ² /24 ur 98 dni) (adjuvantno)
5	Marchetti in sod. (10)	15, različni tipi	Ciklofosamid (25 mg/m ² /24 ur PO)
6	Leach in sod. (11)	36, različni tipi	Klorambucil (4 mg/m ² /24 ur PO) (adjuvantno)
7	Mitchell in sod. (12)	15, različni tipi	CYC (15 mg/m ² /24 ur PO 6 tednov)
8	Schrempp in sod. (13)	33, TCC	Klorambucil (4 mg/m ² /24 ur PO) (adjuvantno)
9	Spugnini in sod. (14)	22 psov in 2 mački, različni tipi	CYC (12,5 mg/m ² /24 ur) (adjuvantno)
10	Bracha in sod. (15)	33, OSA	1. skupina: CYC (10 -12 mg/m ² /24 ur PO) s karboplatinom (300 mg/m ² IV na 3 tedne) (adjuvantno) 2. skupina: CYC s karboplatinom izmenjujočim se z DOX (30 mg/m ² IV 5x) (adjuvantno)
11	London in sod. (16)	156, OSA	1. skupina: karboplatin (300 mg/m ² IV na 3 tedne 4x) (adjuvantno). 2. skupina: karboplatin (enak odmerek) s CYC (10 mg/m ² /48 ur PO) (adjuvantno) 3. skupina: karboplatin (enak odmerek) s CYC (enak odmerek) (adjuvantno) (toceranib skupina) 4. skupina: CYC (7 mg/m ² /48 ur PO) (adjuvantno)
12	Wendelburg in sod. (17)	208, HSA	1. skupina: splenektomija 2. skupina: DOX (25 - 30 mg/m ²) (adjuvantno), na 2-4 tedne, ifosfamide (350 - 425 mg/m ² , na 3 tedne), vinkristin (0,5 - 0,75 mg/m ²) in CYC (150 mg/m ² na 3 tedne IV) 3. skupina: CYC (9,3 - 16,0 mg/m ² /24 ur PO) (adjuvantno) in CYC (enak odmerek) z etoposidom 4. skupina: DOX IV na 2 - 3 tedne in CYC (9,2 - 12,0 mg/m ² /24 ur, PO) (adjuvantno)
13	Rasmussen in sod. (18)	31, različni tipi	1. skupina: DOX (30 mg/m ² , IV, na 3 tedne, 4x) , s CYC (10 - 15 mg/m ² /24 ur, PO) 2. skupina: DOX (enak odmerek) v 2 ciklih in DOX (enak odmerek) s CYC (15 mg/m ² /24 ur, PO)
14	Cancedda in sod. (19)	50, STS	CYC (7 mg/m ² /48 ur PO) (adjuvantno)
15	Finotello in sod. (20)	22, HSA	1. skupina: DOX (30 mg/m ² , IV, na 3 tedne 4 – 5x) ali v kombinaciji z dacarbazinom (200 mg/m ² /24 ur, IV, 5 zaporedne dni za 2 - 4 cikle) (adjuvantno) 2. skupina: protokol 1. skupine, ki mu sledi CYC (7- 15 mg/m ² /24 ur, PO) (adjuvantno)

Št.	Dodatna terapija	Povprečna doba preživetja (mediana vrednost)	Čas prost bolezni (mediana vrednost)	Stranski učinki
1	1. skupina: / 2. skupina: piroksikam	133 dni	126 dni	SHC 22,2 %, stranski učinki na gastrointestinralni sistem (12,5 %)
2	1. skupina: / 2. skupina: piroksikam	/	410 dni	SHC 10 %, stranski učinki na gastrointestinralni sistem (23,3 %)
3	/	/	/	ni bilo stranskih učinkov
4	NSAID in prednizon	237 dni pri OSA brez metastaz, 74 dni pri OSA z metastazami, 120 dni pri HSA	/	trombocitopenija (23,1 %), stranski učinki na gastrointestinralni sistem (25 %), povišana ALT (21,2 %)
5	Celecoxib	3,39 meseca	/	ni bilo stranskih učinkov
6	NSAID	153 dni	61 dni	stranski učinki na gastrointestinralni sistem (11,1%)
7	Toceranib (2,75 mg/kg/48 ur PO 8 tednov)	/	/	stranski učinki na gastrointestinralni sistem (33,3 %)
8	NSAID	221 dni	119 dni	stranski učinki na gastrointestinralni sistem (12,9 %)
9	Piroksikam, lansoprazole	33 tednov	/	stranski učinki na gastrointestinralni sistem (9,1 %)
10	Piroksikam	1. skupina: 217 dni 2. skupina: 189 dni	1. skupina: 192 dni, 2. skupina: 182 dni	blažji stranski učinki pri obeh skupinah
11	1. skupina: / 2. skupina: piroksikam 3. skupina: piroksikam in toceranib 4. skupina: talidomid in piroksikam	1. skupina: / 2. skupina: 242 dni 3. skupina: 318 dni 4. skupina: 757 dni	1. skupina: / 2. skupina: 215 dni 3. skupina: 233 dni 4. skupina: /	SHC, blažji stranski učinki na krvni in gastrointestinalni sistem
12	1. in 2. skupina: / 3. skupina: piroksikam, 4. skupina: NSAID	1. skupina: 1,6m 2. skupina: 3,0 m 3. skupina: 3,4 m 4. skupina: 4,3 m	/	1., 2. in 3. skupina: ni bilo stranskih učinkov 4. skupina: prehodni stranski učinki na krvni in gastrointestinalni sistem
13	/	/	/	ni bilo stranskih učinkov
14	Talidomid	757 dni	/	ni bilo stranskih učinkov
15	1. skupina: / 2. skupina: firocoxib, meloksikam ali piroksikam, talidomid	1. skupina: 168 dni 2. skupina: /	/	2. skupina: SHC

Legenda: HSA = hemangiosarkom, STS = mehkotkvni sarkomi, TCC = karcinom prehodnega epitelija, OSA = osteosarkom, DOX = doksiciklin, CYC = ciklofosfamid, SHC = sterilni hemoragični cistitis, ALT = alanin aminotransferaza

Legend: HSA = hemangiosarcoma, STS = soft tissue sarcoma, TCC = transitional cell carcinoma, OSA = osteosarcoma, DOX = doxycycline, CYC = cyclophosphamide, SHC = sterile hemorrhagic cystitis, ALT = alanine aminotransferase

2.3.4 Sočasna uporaba drugih zdravil z metronomsko kemoterapijo

Zdravljeni psi običajno sočasno z metronomsko kemoterapijo dobivajo še druga zdravila.

Najpogosteje se uporabljajo NSAID. Vnetni mediatorji igrajo ključno vlogo pri preživetju in rasti tumorskih celic (3). Ciklooksigenaza-1 (COX-1) se pojavlja v normalnem tkivu in v malignih tumorjih psov, medtem ko je COX-2 prisotna le v tumorskih in vnetnih celicah kot odziv na citokine in tumorske promotorje (43). Poleg tega je COX-2 izražena znotraj tumorskega ožilja in ima angiogeni ter imunogeni učinek. NSAID inhibirajo obe molekuli. Piroksikam je nespecifični inhibitor COX-1 in COX-2. Zaradi protitumorskega učinka se lahko uporablja skupaj z metronomsko kemoterapijo, a ima lahko neželene stranske učinke na gastrointestinalni sistem in ledvično funkcijo. Izmed NSAID so v večini kliničnih raziskav izbrali piroksikam (3), le v eni so izbrali celekoksib (10).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KRITERIJI ZA VKLJUČITEV V RAZISKAVO

Raziskavo smo opravili na Kliniki za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani (VF UL), v obdobju od 15. 3. 2018 do vključno 5. 3. 2020. V raziskavo je bilo vključenih 39 psov z različnimi tumorji. Metronomsko kemoterapijo smo uporabili kot metodo zdravljenja prvega izbora ali kot adjuvantno terapijo po kirurški odstranitvi ali elektrokemoterapiji z genskim elektroprenosom (ECT/EGT, *ang. electrochemotherapy with gene electrotransfer*). Pogoj za začetek terapije z metronomsko kemoterapijo so bile normalne vrednosti jetrnih in ledvičnih encimov, kar smo predhodno preverili z biokemijsko preiskavo krvi.

3.2 KLINIČNI PREGLED Z DOLOČANJEM KLINIČNEGA STADIJA BOLEZNI

Ob prvem pregledu smo pri vsaki živali vključeni v raziskavo zabeležili osnovne podatke (starost, spol, pasma), odvzeli anamnezo, žival klinično pregledali, ji odvzeli kri za krvne preiskave in prvič izmerili in zavedli vse podatke o tumorju. Vzorec tumorja smo odvzeli aspiracijsko s tanko igelno (TIAB) in/ali incizijsko biopsijo. Citološki pregledi vzorcev TIAB (20 tumorjev) so bili opravljeni na Kliniki za male živali VF UL in na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele (IPDRČ) VF UL, histopatološke (19 tumorjev) in imunohistokemične (10 tumorjev) preiskave tkivnih vzorcev pa na IPDRČ VF UL.

Odmerek ciklofosfamida je bil 12,5 mg/m²/24 ur (od 6,25 do 25 mg/m²/24 ur).

Zdravljeni pse smo spremljali na mesečnih kontrolnih pregledih. Pri odvzemu anamneze smo lastnike spraševali o splošnem stanju živali in morebitnih spremembah v obnašanju. Tumor smo izmerili s kljunastim merilom, ga fotografirali in odvzeli kri za krvne preiskave. Poleg kliničnega pregleda smo pri nekaterih psih opravili dodatne preiskave za določanje kliničnega stadija bolezni: rentgensko slikanje prsnega koša pri 12 psih (31 %), ultrazvočni pregled trebušne votline pri 10 psih (26 %) in računalniško tomografijo pri 11 psih (28 %). Z metodami slikovne diagnostike smo preverjali tudi odziv globoko ležečih tumorjev na zdravljenje.

V kolikor smo ugotovili vsaj minimalni objektivni odziv na zdravljenje in ni prišlo do pojava neželenih stranskih učinkov, smo metronomsko kemoterapijo s ciklofosfamidom nadaljevali.

Z merjenjem velikosti tumorjev smo spremljali odziv tumorjev na metronomsko kemoterapijo in določili odziv na zdravljenje po kriterijih RECIST. Po kriterijih RECIST delimo odziv tumorjev na terapijo v 4 skupine. Popolni odziv (CR, *ang. complete response*) pomeni popolno izginotje tumorja. Delni odziv (PR, *ang. partial response*) pomeni vsaj 30 % zmanjšanje tumorja. Napredovala bolezen (PD, *ang. progressive disease*) pomeni ali pojav enega ali več novih tumorjev ali vsaj 20 % povečanje tumorja. Stabilna bolezen (SD, *ang. stable disease*) pa pomeni, da se je tumor zmanjšal za manj kot 30 % ali povečal za največ 20 % (5).

3.3 ANALIZA IZBRANIH LABORATORIJSKIH PARAMETROV

Določali smo hemogram in diferencialno bela krvno sliko, izbrane biokemijske parametre (sečnina, kreatinin, alanin aminotransferaza in alkalna fosfataza) in koagulacijske parametre (protrombinski čas in aktivirani parcialni tromboplastinski čas).

Enkrat mesečno smo odvzeli 5 ml venske krvi z 22G iglo (BD MicrolanceTM 3, Fraga, Španija) in 5 ml brizgo (Chirana T. injecta®, Stara Tura, Slovaška) iz ene od perifernih ven glede na presojo veterinarja (*v. cephalica antebrachii* ali *v. saphena lateralis*) oziroma iz vratu pri majhnih psih (*v. jugularis*) z 23G iglo (BD MicrolanceTM 3).

Za hematološke preiskave smo vzorec odvzete krvi prenesli iz brizge v 0,5 ml epruveto z dodanim antikoagulantom K₃EDTA (kalijeva sol etilendiaminotetraacetne kisline; BD Microtainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA). Vzorec smo po odvzemenu analizirali neposredno iz epruvet pri sobni temperaturi (20-24°C) v manj kot polurnem časovnem obdobju.

Za biokemijske preiskave smo prenesli 4 ml prej odvzete krvi iz brizge v epruveto z dodanim aktivatorjem strjevanja krvi in separacijskim gelom (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Avstrija). Vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 1300 obratih na minuto pri 20 °C po predhodni polurni koagulaciji. Želene preiskave smo opravili v 3 urah po odvzemenu vzorcev.

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

Za koagulacijske preiskave smo 1,3 ml vzorca odvzete krvi iz brizge prenesli v epruveto z dodanim natrijevim citratom (Micro-tube, Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija). S centrifugiranjem pri 2000 obratih na minuto na sobni temperaturi za 15 minut smo tako pridobili citratno plazmo. Vzorec smo po odvzemuh analizirali v manj kot polurnem časovnem obdobju.

3.3.1 Laboratorijske preiskave krvnih vzorcev

Hematološke preiskave so bile opravljene z avtomatskim laserskim hematološkim analizatorjem Advia 120 (Siemens, München, Nemčija), ki deluje po principu pretočne citometrije in citokemije.

Biokemijske preiskave so bile opravljene na avtomatskem biokemijskem analizatorju RX Daytona (Randox, Crumlin, Velika Britanija) s pomočjo ustreznih reagentov (Randox).

Koagulacijske preiskave so bile opravljene s koagulacijskim analizatorjem Start® 4 (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, Francija). Pri preiskavi sta bila uporabljena reagenta Cephascreen® (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, Francija) za analizo aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa in Neoplastine® CI PLUS (Diagnostica Stago) za analizo protrombinskega časa.

Vse krvne preiskave smo opravili v Diagnostičnem laboratoriju Klinike za male živali VF UL.

3.4 OBDELAVA VZORCEV TUMORJEV ZA CITOLOŠKO PREISKAVO

Za citološko preiskavo smo vzorec tumorja vzeli aspiracijsko s tanko iglo (22G BD Microlance™ 3) in 5 ml brizgo (Chirana T. injecta®). Vzorec smo iztisnili na predmetno stekelce, pripravili razmaz ter ga pobarvali z barvanjem po Giemsi ter nato ocenili pod svetlobnim mikroskopom (Nikon Eclipse Ci, Kingston upon Thames, Velika Britanija). Vzorci 8 zdravljenih psov so bili pregledani v Diagnostičnem laboratoriju KMŽ VF UL, 7 psov pa na IPDRČ VF UL, ostalih 5 je bilo diagnosticiranih drugje. Skupno je bilo tako s citološko preiskavo diagnosticiranih 20 tumorjev.

3.5 OBDELAVA VZORCEV TUMORJEV ZA HISTOPATOLOŠKO IN IMUNOHISTOKEMIČNO PREISKAVO

Vzorci 19 tumorjev so bili po inzicijski biopsiji fiksirani v 10 % purferiranem formalinu in kasneje s parafinom impregnirani s pomočjo naprav Excelsior AS (Thermo Scientific®) in Microm EC350 (Thermo Scientific®). 10 tumorjev smo še imunohistokemično označili s protitelesoma proti VEGF in Willebrandovemu faktorju (vWF, *ang. von Willebrand factor*). Histopatološko in imunohistokemično preiskavo smo opravili na IPDRČ VF UL.

3.5.1 Barvanje s hematoksilinom in eozinom

Iz parafinskih blokov smo z drsnim mikrotomom (Leica®) narezali 4 µm debele tkivne rezine, ki smo jih nato deparafinizirali v ksilolu in padajoči vrsti alkoholov terobarvali s hematoksilinom in eozinom (HE) v napravi Gemini (Thermo Scientific®). Po zaključenem barvanju smo rezine dehidrirali v naraščajoči vrsti alkoholov in postopek končali z bistrenjem v ksilolu. Nato smo obarvane rezine pokrili s sintetično smolo in pokrovnim stekelcem. Barvanje smo izvedli po protokolu, ki je v uporabi na IPDRČ VF UL.

3.5.1.1 Postopek barvanja s hematoksilinom in eozinom

- 1) Deparafinizacija tkivnih rezin v ksilolu (3 krat po 2 minuti), nato rehidracija v padajoči vrsti alkoholov (v 100 % alkoholu 2 krat po 2 minuti in v 96 % alkoholu 2 minuti).
- 2) Spiranje v tekoči vodi (2 minuti).
- 3) Barvanje v raztopini Mayerjevega hematoksilina - 2 minuti.
- 4) Spiranje v tekoči vodi - 3 minute.
- 5) Kratko spiranje v destilirani vodi - 1,5 minute.
- 6) Barvanje v vodni raztopini eozina in floksina - 3 minute.
- 7) Spiranje v tekoči vodi - 1,5 minute.
- 8) Dehidracija v naraščajoči vrsti alkoholov (96 % alkohol 2 minuti, 100 % alkohol 2 krat po 1 minuto), bistrenje v ksilolu - 3 krat po 2 minuti.
- 9) Pokrivanje obarvanih tkivnih rezin s sintetično smolo in pokrovnim stekelcem.

Pri barvanju s hematoksilinom in eozinom se citoplazma in eozinofilne strukture obarvajo z različnimi odtenki rdeče. Jedra se obarvajo modro vijolično do sivovijolično.

3.5.2 Imunohistokemično označevanje: postopek, pozitivne in negativne kontrole

Na objektna steklca prevlečena s 3-aminopropiltritoksilanom (APTES) smo prenesli 4 µm debele parafinske tkivne rezine ter jih čez noč sušili v termostatu pri temperaturi 45 °C. Tkvne rezine smo pred imunohistokemičnim označevanjem deparafinizirali v napravi Gemini (Thermo Scientific®).

Imunohistokemično označevanje smo ročno izvedli z vizualizacijskim kitom Dako REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007).

3.5.2.1 Postopek imunohistokemičnega označevanja

- 1) Deparafinizacija tkivnih rezin do vode.
- 2) Demaskiranje antigenov z mikrovalovi v citratnem pufru s pH 6,0 – 20 minut (za rezine, ki smo jih označili s protitelesom vWF in EDTA pufru s pH 9,0 – 10 minut (za rezine, ki smo jih označili s protitelesom proti VEGF).
- 3) Hlajenje rezin do sobne temperature.
- 4) Spiranje v izpiralnem pufru (TRIS-HCl-NaCl pufer s pH 7,5) – 5 minut.
- 5) Inkubacija s primarnim protitelesom v vlažni komori. Na osnovi predhodne optimizacije postopkov smo v tej fazи uporabili naslednji protitelesi:
 - protitelo proti VEGF (MA5-13182, ThermoFisher Scientific) – redčitev protitelesa 1:25, inkubacija – 1 ura na sobni temperaturi.
 - protitelo proti vWF (A008202-5, Agilent) – redčitev protitelesa 1:300, inkubacija – 1 ura na sobni temperaturi.
- 6) Spiranje v izpiralnem pufru (TRIS-HCl-NaCl pufer s pH 7,5) – 5 minut.
- 7) Inhibicija endogene peroksidaze s Peroxidase-Blocking Solution Dako REAL™ (DAKO) – 30 minut.
- 8) Spiranje v izpiralnem pufru (TRIS-HCl-NaCl pufer s pH 7,5) – 5 minut.

- 9) Inkubacija s sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s polimerom in označenimi s hrenovo peroksidazo, v vlažni komori pri sobni temperaturi – 30 minut.
Uporabili smo sekundarna protitelesa iz vizualizacijskega kita DAKO REALTM EnVisionTM Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007).
- 10) Spiranje v izpiralnem pufru (TRIS-HCl-NaCl pufer s pH 7,5) – 5 minut.
- 11) Inkubacija v delovni raztopini barvnega substrata s 3-diaminobenzidinom (DAB) pri sobni temperaturi – 7 minut. Raztopino barvnega substrata smo pred uporabo pripravili tako, da smo 1 ml pufra iz kita (Substrate Buffer) dodali 20 µl kromogena iz kita (DAB + Chromogen).
- 12) Spiranje z destilirano vodo in kontrastiranje z Meyerjevim hematoksilinom – 1 minuto.
- 13) Spiranje v puferirani fiziološki raztopini (PBS, *ang.* phosphate buffer saline) s pH 7,2 – 1 minuto.
- 14) Spiranje v tekoči vodi 20 minut, dehidracija v naraščajoči vrsti alkoholov, bistrenje v ksilolu in pokrivanje s sintetično smolo.

Pri imunohistokemičnem označevanju vidimo pozitivno reakcijo kot rjav reakcijski produkt. Po kontrastiranju s hematoksilinom se jedra celicobarvajo nežno modro-sivo.

3.5.2.2 Pozitivne in negativne kontrole pri imunohistokemičnem označevanju

Pri imunohistokemičnem označevanju s protitelesom proti VEGF smo kot pozitivno kontrolo uporabili ledvico psa, pri označevanju s protitelesom proti vWF pa kožo psa. Kot negativno kontrolo smo pri obeh uporabili zaporedno tkivno rezino, na katero nismo nanesli primarnega protitelesa.

3.5.3 Merila za ocenjevanje imunohistokemične reakcije na VEGF in določitev gostote malih krvnih žil

Imunohistokemično označene tkivne rezine smo pregledali s svetlobnim mikroskopom (Nikon), ki je bil povezan z digitalno kamero DS-U2 (Nikon).

Tumorske celice smo označili kot pozitivne na izražanje VEGF, če smo ugotovili značilno rjavo zrnato obarvanje citoplazme. Glede na odstotek imunohistokemično označenih tumorskih celic smo tumorje označili z naslednjimi ravnimi izražanja: VEGF 0 – če je bilo obarvanih manj kot 25 % tumorskih celic, VEGF 1 – če je bilo obarvanih 25 – 50 % tumorskih celic, VEGF 2 – če je bilo obarvanih 50 – 75 % tumorskih celic, in VEGF 3 – če je bilo obarvanih več kot 75 % tumorskih celic. Jakost imunohistokemične reakcije na VEGF smo označili s stopnjama: 1 – če je bilo obarvanje šibko, in 2 – če je bilo obarvanje močno (45). Za nadaljno statistično obdelavo smo sešteli raven izražanja in jakost imunohistokemične reakcije.

Gostoto malih krvnih žil smo določili na tkivih rezinah, imunohistokemično označenih s protitelesom proti vWF. V vsakem tumorju smo s pomočjo programa NIS-Elements Basic Research® (Nikon) na desetih naključno izbranih poljih 400-kratne povečave prešteli krvne žile (45).

3.6 STATISTIČNE METODE

Izbrane parametre: doba preživetja, čas prost bolezni ter odziv na zdravljenje glede na trajanje zdravljenja in ob koncu opazovalnega obdobja pri zdravljenih psih smo primerjali s podatki iz literature za posamezno vrsto raka.

Za statistično analizo smo uporabili program SigmaPlot 11.0 (Systat Software, San Jose, Kalifornija, ZDA). Opravili smo test normalnosti porazdelitve podatkov in določili srednje vrednosti s pripadajočo standardno napako. V primeru normalne porazdelitve podatkov smo za primerjavo med skupinami opravili enosmerno analizo variance (ANOVA). Če podatki niso bili normalno porazdeljeni, smo uporabili Kruskal Wallisov test za primerjavo medianih vrednosti podatkov. Krivulje preživetja psov smo pridobili s Kaplan-Meierjevo analizo preživetja.

4 REZULTATI

4.1 PODATKI O ŽIVALIH

V raziskavo je bilo vključenih 39 psov, katerih srednja vrednost starosti je bila $9,90 \pm 2,85$ let (od 4,5 do 14,5 let). Od teh je bilo 18 psov ženskega spola in 21 psov moškega spola. Srednja vrednost telesne mase je bila $28,60 \pm 11,73$ kg (od 3,00 do 43,07 kg). Psi so bili različnih pasem. Najpogosteje so se pojavili mešanci v 31 % (12/39) ter borderski ovčarji, labradorci in beagli (3/39, 8 %) (Tabela 2).

Tabela 2: Podatki o psih, vključenih v raziskavo o metronomski kemoterapiji

Table 2: Information about dogs included in the study about metronomic chemotherapy

ZŠP	Pasma psa	Starost (leta)	Spol	Odmerek ciklofosfamida (mg/m ² /24 ur)	Dodatna terapija
1	Mešanec	12	ženski	25	prednizolon (0,5 mg/kg/24 ur)
2	Mešanec	12	moški	12,5	meloksikam (0,1 mg/kg/24 ur)
3	Nemški ovčar	11	moški	12,5	karprofen (1,25 mg/kg/12 ur)
4	Mešanec	12	ženski	12,5	karprofen (2 mg/kg/12 ur)
5	Borderski ovčar	10,5	ženski	12,5	/
6	Mešanec	6	ženski	12,5	/
7	Borderski ovčar	11	moški	12,5	karprofen (2 mg/kg/24 ur)
8	Nemški bokser	7	moški	25	prednizolon (1 mg/kg/24 ur)
9	Mešanec	12	moški	6,25	karprofen (2 mg/kg/12 ur)
10	Mešanec	14,5	ženski	12,5	/
11	Labradorec	11	moški	12,5	/
12	Beagle	9,5	ženski	25	/
13	Mešanec	9,5	ženski	12,5	/
14	Cavalier King Charles španjel	7,5	moški	6,25	
15	Zlati prinašalec	9	ženski	12,5	/
16	Beagle	9,5	moški	25	/
17	Beagle	12	moški	12,5	meloksikam (0,3 mg/kg/48 ur)
18	Beauceron	9,5	moški	12,5	/
19	Mešanec	14	moški	25	karprofen (3 mg/kg/12 ur)

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

20	Nemški ovčar	7,5	moški	12,5	/
21	Mešanec	11,5	ženski	12,5	karprofen (1,7 mg/kg/12 ur)
22	Borderski ovčar	11,5	moški	12,5	piroksikam (0,3 mg/kg/24 ur)
23	Češkoslovaški volčjak	9,5	ženski	12,5	piroksikam (0,3 mg/kg/24 ur)
24	Mali nemški špic	14	ženski	25	/
25	Shih-tzu	5,5	moški	25	/
26	Sibirski husky	6	moški	12,5	/
27	Hovawart	12,5	ženski	12,5	/
28	Kratkodlaki foksterier	6	ženski	6,25	karprofen (4 mg/kg/12 ur)
29	Mešanec	14	ženski	12,5	karprofen (2 mg/kg/12 ur)
30	Afganistanski hrt	11	moški	12,5	karprofen (2,4 mg/kg/12 ur)
31	Labradorec	12,5	ženski	12,5	piroksikam (0,3 mg/kg/24 ur)
32	Zlati prinašalec	10	ženski	12,5	metilprednizolon (1 mg/kg/24 ur)
33	Mešanec	4,5	moški	12,5	/
34	Ruski hrt	12	ženski	25	karprofen (1,5 mg/kg/12 ur)
35	Mešanec	8	moški	12,5	/
36	Francoski bulldog	11	moški	25	/
37	Zahodnovišavski beli terier	14,5	moški	6,25	meloksikam (0,3 mg/kg /24 ur)
38	Ameriški bulldog	6,5	ženski	12,5	karprofen (1,7 mg/kg/12 ur)
39	Labradorec	5	moški	12,5	/

Legenda: ZŠP = zaporedna številka psa

Legend: ZŠP = serial number of a dog

4.2 REZULTATI KLINIČNE RAZISKAVE

4.2.1 Podatki o diagnosticiranih tumorjih

V raziskavo je bilo vključenih 39 psov, opravljena je bila citološka preiskava 20 tumorjev in histopatološka preiskava 19 tumorjev. Tumorje smo za namen raziskave razdelili v tri skupine: 14 mezenhimskih, 14 epitelnih in 11 oralnih tumorjev. 16 tumorjev smo ugotovili na področju glave, 9 na področju reprodukcijskega sistema, 8 na okončinah, 2 na trupu, 3 na pljučih in en v trebušni votlini (Tabela 3, 4, 5).

Srednja vrednost velikosti tumorjev pri 21 psih je pred zdravljenjem znašala $67,03 \pm 94,02 \text{ cm}^3$ (od 1,77 do 408,68 cm^3), pri 18 psih pa velikost tumorja zaradi lokacije ni bila izmerljiva.

4.2.2 Odmerjanje in klinični način zdravljenja

Psi, zdravljeni z metronomsko kemoterapijo, so prejemali ciklofosfamid z minimalnim učinkovitim odmerkom $12,5 \text{ mg/m}^2/24 \text{ ur}$ (od 6,25 do $25 \text{ mg/m}^2/24 \text{ ur}$).

Poleg kemoterapevtika je 18 psov prejemoalo NSAID (od teh 3 meloksikam (od 0,1 do 0,3 $\text{mg/kg}/24 \text{ ur}$), 11 karprofen (od 1,25 do 4 $\text{mg/kg}/12 \text{ ur}$) in 4 piroksikam ($0,3 \text{ mg/kg}/24 \text{ ur}$)) in 3 kortikosteroide (1 metilprednizolon ($1 \text{ mg/kg}/24 \text{ ur}$) in 2 prednizolon (od 0,5 do 1 $\text{mg/kg}/24 \text{ ur}$)).

Pri 35 psih je bilo zdravljenje z metronomsko kemoterapijo terapija prvega izbora, pri 4 psih pa je metronomska kemoterapija predstavljala adjuvantno zdravljenje (pri 3 po primarni kirurški odstranitvi, pri enem po kombinaciji kirurške odstranitve in ECT/EGT) (Tabela 3, 4, 5).

4.2.3 Povprečen čas zdravljenja in čas opazovanja

Srednji čas zdravljenja vključenih psov (25/39) je bil $191 \pm 97 \text{ dni}$ (od 47 do 418 dni).

Srednji čas opazovanja vključenih psov (25/39) je bil $317 \pm 192 \text{ dni}$ (od 47 do 659 dni).

4.2.4 Stranski učinki

Od stranskih učinkov smo pri 6/39 psih (15 %) zaznali pojav sterilnega hemoragičnega cistitisa, ki se je v povprečju pojavil po 130 dneh terapije (od 63 do 245 dni). V 3 primerih smo terapijo nadaljevali v enakem odmerku po 10 in 24 dneh, pri enem psu prekinitve terapije ni bila potrebna, saj so stranski učinki samodejno izzveneli, pri 3 pa smo z metronomsko kemoterapijo po pojavu stranskih učinkov zaključili in prešli na drugo vrsto zdravljenja (Tabela 2, 3, 4).

Pri nobenem zdravljenem psu nismo ugotovili klinično pomembnih odstopanj pri mesečnem spremeljanju hematoloških in izbranih biokemijskih parametrov ali koagulacijskem profilu. Rezultate spremeljanih parametrov pri posameznih pacientih navajamo v Prilogi 1.

Tabela 3: Podatki o psih z mezenhimskimi tumorji

Table 3: Information about dogs with mesenchymal tumours

ZŠP	Tip tumorja	Lokacija tumorja	Diagnostika (CP, HP)	Velikost tumorja (cm ³)	MK: TPI/ADT	Pojav SHC	Čas opazovanja (dni)
1	Mehkotkvivi sarkom	vrat	CP	NP	TPI	ne	173
2	Mehkotkvivi sarkom	smrček	HP	2,14	TPI	ne	659
3	Mehkotkvivi sarkom	z. noge	HP	NP	TPI	ne	571
4	Sarkom	glava	CP	20,93	TPI	ne	238
5	Mehkotkvivi sarkom	prsni koš	CP	34,13	TPI	ne	151
6	Miksosarkom	perianalno	HP	195,78	ADT (KRG)	da	355
7	Liposarkom	sp. noge	CP	NP	TPI	da	455
8	FSA	z. noge	CP	16,66	TPI	da	465
9	Osteosarkom	glava	CP	NP	TPI	ne	20
10	Hondrosarkom	rebra	CP	408,68	ADT (KRG)	ne	21
11	Nevrofibrosarkom	sp. noge	HP	NP	TPI	ne	630
12	Nevrofibrosarkom	sp. noge	HP	4,15	TPI	ne	605
13	Mehkotkvivi sarkom	sp. noge	CP	2,31	TPI	ne	135
14	MPNST	sp. noge	HP	1,77	ADT (KRG)	ne	470

Legenda: ZŠP = zaporedna številka psa, FSA= fibrosarkom, MPNST = maligni tumor ovojnice perifernih živcev, CP = citološka preiskava, HP = histopatološka preiskava, MK = metronomska kemoterapija, TPI = terapija prvega izbora, ADT = adjuvantna terapija, KRG = kirurška odstranitev, SHC = sterilni hemoragični cistitis, NP = ni podatka

Legend: ZŠP = serial number of a dog, FSA= fibrosarcoma, MPNST = malignant peripheral nerve sheath tumour, CP = cytological examination, HP = histopathological examination, MK = metronomic chemotherapy, TPI = first choice therapy, ADT = adjuvant therapy, KRG = surgical removal, SHC = sterile hemorrhagic cystitis, NP = no data

Tabela 4: Podatki o psih z epitelnimi tumorji

Table 4: Information about dogs with epithelial tumours

ZŠP	Tip tumorja	Lokacija tumorja	Diagnostika (CP, HP)	Velikost tumorja (cm ³)	MK: TPI/ADT	Pojav SHC	Čas opazovanja (dni)
15	Karcinom	prostata	CP	35,40	TPI	ne	218
16	Karcinom	prostata	CP	47,12	TPI	ne	231
17	AC	perianalna žleza	CP	22,00	TPI	ne	276
18	AC	analna vrečka	CP	109,96	TPI	ne	151
19	AC	rekutm	HP	NP	TPI (ADT Palladia)	ne	240
20	AC	mlečna žleza	CP	NP	TPI	ne	16
21	Karcinom	pljuča	CP	NP	TPI	ne	15
22	Karcinom	pljuča	CP	NP	TPI	ne	344
23	Karcinomatoza	abdomen	CP	NP	TPI	ne	15
24	Karcinom	z. noge	HP	NP	TPI	ne	13
25	Inflamatorični karcinom	mlečna žleza	HP	NP	TPI	ne	35
26	AC	glava	HP	NP	TPI	ne	30
27	AC apokrinih žlez	analne vrečke	CP	NP	TPI	ne	196
28	Karcinom	pljuča	CP	NP	TPI	ne	106

Legenda: ZŠP = zaporedna številka psa, AC = adenokarcinom, CP = citološka preiskava, HP = histopatološka preiskava, MK = metronomska kemoterapija, TPI = terapija prvega izbora, ADT = adjuvantna terapija, SHC = sterilni hemoragični cistitis, NP = ni podatka

Legend: ZŠP = serial number of a dog, AC = adenocarcinoma, CP = cytological examination, HP = histopathological examination, MK = metronomic chemotherapy, TPI = first choice therapy, ADT = adjuvant therapy, SHC = sterile hemorrhagic cystitis, NP = no data

Tabela 5: Podatki o psih z oralnimi tumorji

Table 5: Information about dogs with oral tumours

ZŠP	Tip tumorja	Lokacija tumorja	Diagnostika (CP, HP)	Velikost tumorja (cm ³)	MK: TPI/ADT	Pojav SHC	Čas opazovanja (dni)
29	Osteosarkom	maksila	CP	38,19	TPI	ne	60
30	SCC	tonzile	HP	100,00	TPI	ne	637
31	SCC	tonzile	CP	NP	TPI	ne	47
32	OM	dlesen	HP	160,75	TPI	ne	4
33	FSA	zg. čeljust	HP	45,81	TPI	da	337
34	sarkom / amelanotični melanom	dlesen	HP	65,45	TPI	da	191
35	FSA	dlesen	HP	NP	TPI	ne	162
36	OM/ nevrofibrosarkom	ustnica	HP	42,88	ADT (KRG, ECT/EGT)	ne	15
37	SCC	dlesen	HP	NP	TPI	ne	31
38	Karcinom	dlesen	HP	47,71	TPI	ne	70
39	SCC	dlesen	HP	5,89	TPI	da	206

Legenda: ZŠP = zaporedna številka psa, SCC = plošcatocelični karcinom, OM = oralni melanom, FSA= fibrosarkom, CP = citološka preiskava, HP = histopatološka preiskava, MK = metronomska kemoterapija, TPI = terapija prvega izbora, ADT = adjuvantna terapija, KRG = kirurška odstranitev, ECT/EGT = elektrokemoterapija z genskim elektroprenosom, SHC = sterilni hemoragični cistitis, NP = ni podatka

Legend: ZŠP = serial number of a dog, SCC = squamous cell carcinoma, OM = oral melanoma, FSA = fibrosarcoma, CP = cytological examination, HP = histopathological examination, MK = metronomic chemotherapy, TPI = first choice therapy, ADT = adjuvant therapy, KRG = surgical removal, ECT/EGT = electrochemotherapy with gene electrotransfer, SHC = sterile hemorrhagic cystitis, NP = no data

4.2.5 Uspešnost metronomske kemoterapije pri psih z različnimi tipi tumorjev

4.2.5.1 Psi, izključeni iz raziskave

Iz raziskave smo izključili 14/39 (36 %) psov. 11 psov smo iz raziskave izključili, zaradi prekratkega trajanja zdravljenja z metronomsko kemoterapijo (manj kot en mesec), 2 psa, ker ni bilo mogoče spremljanje (lastniki so se odločili za izstop iz raziskave) in enega zaradi hitrega napredovanja bolezni. Večina od psov, izključenih iz raziskave (11/14, 79 %) je poginila ali bila evtanazirana zaradi napredovanja bolezni, pri ostalih pa smo izgubili sledljivost ali nismo mogli dokazati povezave pogina z onkološko boleznijo (Tabela 6).

Tabela 6: Podatki o psih, izključenih iz raziskave

Table 6: Information about dogs excluded from the study

ZŠP	Tip tumorja	Vzrok izključitve	Vzrok pogina ali evtanazije
9	Osteosarkom	premalo časa na terapiji	PD
10	Hondrosarkom	ni meritev	PD
18	AC analnih vrečk	ni meritev	NP
19	AC rektuma	premalo časa na terapiji	PD
20	AC mlečne žleze	premalo časa na terapiji	PD
21	Karcinom pljuč	premalo časa na terapiji	PD
23	Karcinomatoza	premalo časa na terapiji	PD
25	Inflamatorični karcinom	premalo časa na terapiji	PD
26	AC glava	premalo časa na terapiji	PD
28	Karcinom pljuč	premalo časa na terapiji	PD
29	Osteosarkom	PD	NP
32	OM	premalo časa na terapiji	NP
36	OM/nevrofibrosarkom	premalo časa na terapiji	PD
37	Oralni SCC	premalo časa na terapiji	PD

Legenda: ZŠP = zaporedna številka psa, AC = adenokarcinom, OM = oralni melanom, SCC = ploščatocelični karcinom, PD = napredovala bolezen, NP = ni podatka

Legend: ZŠP = serial number of a dog, AC = adenocarcinoma, OM = oral melanoma, SCC = squamous cell carcinoma, PD = progressive disease, NP = no data

4.2.5.2 Rezultati metronomske kemoterapije psov z mezenhimskimi tumorji

V skupini z mezenhimskimi tumorji je bilo vključeno 12/39 (31 %) psov. Od teh se je pri 3/12 (25 %) psov pojavil SHC. Pri 3/12 (25 %) psih smo po metronomski kemoterapiji zaznali popolno regresijo tumorja. Povprečen čas zdravljenja je bil 196 dni in povprečen čas opazovanja 434 dni (Tabela 7). Slike 1, 2 in 3 prikazujejo odziv treh mezenhimskih tumorjev na metronomsko kemoterapijo.

Tabela 7: Podatki o zdravljenju psov z mezenhimskimi tumorji

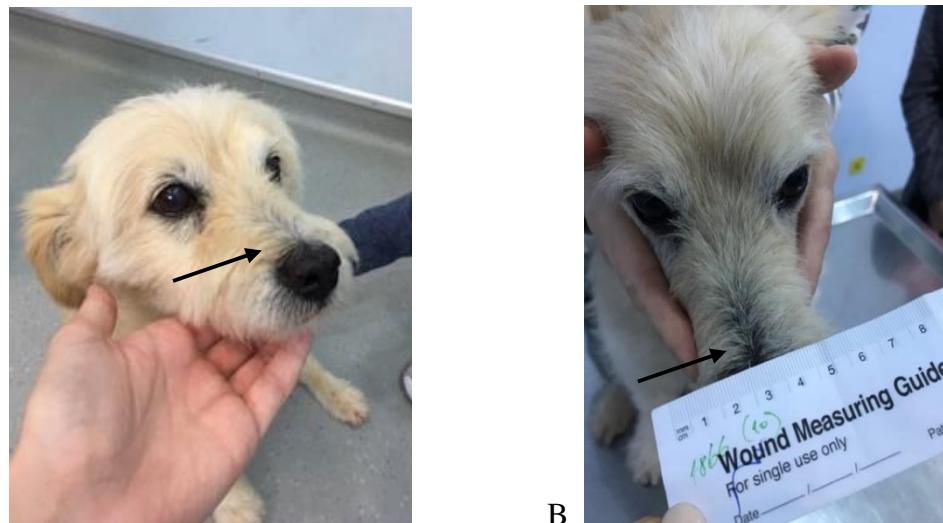
Table 7: Information about treatment of dogs with mesenchymal tumours

ZŠP	Tip tumorja	SHC	Čas zdravljenja (dni)	Čas opazovanja (dni)	RECIST
1	Mehkotkvni sarkom	ne	173	173	SD
2	Mehkotkvni sarkom	ne	395	659*	CR
3	Mehkotkvni sarkom	ne	338	571*	PD
4	Sarkom	ne	48	238*	PD
5	Mehkotkvni sarkom	ne	151	151*	PD
6	Miksosarkom	da	245	355*	PD
7	Liposarkom	da	237	455*	CR
8	FSA, dva MKT	da	123	465*	PD
11	Nevrofibrosarkom	ne	183	630*	PR
12	Nevrofibrosarkom	ne	113	605*	PR
13	Mehkotkvni sarkom	ne	135	135§	SD
14	MPNST	ne	212	470*	CR

Legenda: ZŠP = zaporedna številka psa, FSA= fibrosarkom, MKT = mastocitom, MPNST= maligni tumor ovojnice perifernih živcev, SHC = sterilni hemoragični cistitis, RECIST = odgovor po 6 mesecih ali po koncu terapije, če se je ta zaključila prej kot v 6 mesecih, SD = stabilna bolezen, CR = popolni odziv, PD = napredovala bolezen, PR = delni odziv, * = živ ob koncu opazovanega obdobja, § = pogin zaradi drugega vzroka

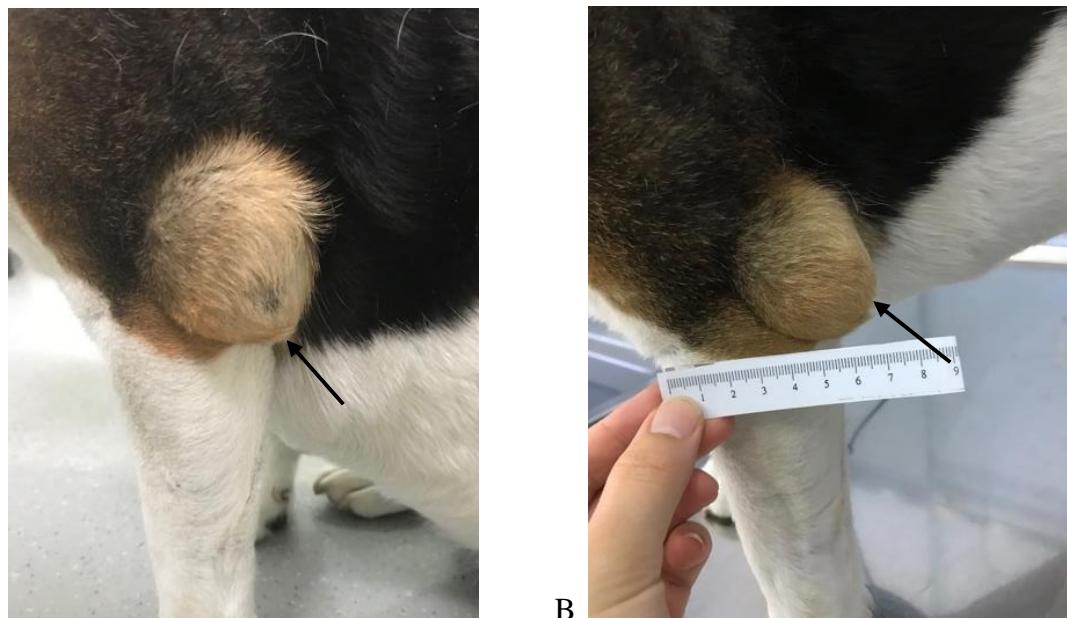
Legend: ZŠP = serial number of a dog, FSA = fibrosarcoma, MKT = mastocytoma, MPNST= malignant peripheral nerve sheath tumor, SHC = sterile hemorrhagic cystitis, RECIST = response evaluation criteria in solid tumours after 6 months or at the end of therapy if that ended before the 6-month period, SD = stable disease, CR = complete response, PD = progressive disease, PR = partial response, * = alive at the end of obersvation period, § = death from another cause

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.



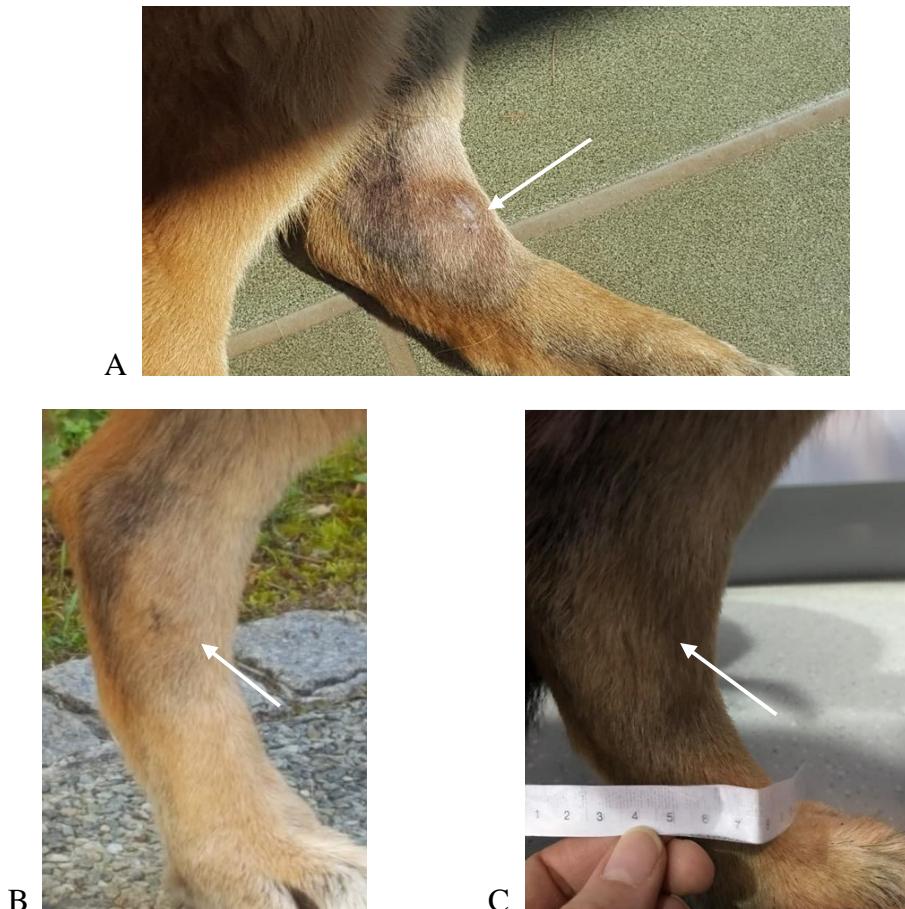
Slika 1: Pes št. 2 z mehkotkivnim sarkomom (puščica) na smrčku. Odziv po 8 mesecih zdravljenja je bil CR (čas opazovanja 659 dni). A. Ob začetku zdravljenja. B. 8 mesecev po začetku zdravljenja.

Figure 1: Dog no. 2 with soft tissue sarcoma (arrow) on muzzle. Response after 8 months of treatment was CR (observation time 659 days). **A.** Before the treatment. **B.** After 8 months of treatment.



Slika 2: Pes št. 12 z nevrofibrosarkomom (puščica) na sprednji nogi. Odziv po 4 mesecih zdravljenja je bil PR (čas opazovanja 605 dni). A. Ob začetku zdravljenja. B. 4 mesecev po začetku zdravljenja.

Figure 2: Dog no. 12 with neurofibrosarcoma (arrow) on front leg. Response after 4 months of treatment was PR (observation time 605 days). **A.** Before the treatment. **B.** After 4 months of treatment.



Slika 3: Pes št. 3 z mehkotkivnim sarkomom (puščica) na zadnji nogi. Odziv po 3 mesecih zdravljenja je bil CR. Po 6 mesecih je prišlo do ponovitve bolezni, zato je bila terapija ponovno uvedena. Ob koncu opazovanega obdobja (571 dni) je prišlo do napredovanja bolezni. A. Ob začetku zdravljenja. B. 1 mesec po začetku zdravljenja. C. 3 mesece po začetku zdravljenja.

Figure 3: Dog no. 3 with soft tissue sarcoma (arrow) of the hind leg. Response 3 months after treatment was CR. After 6 months there was a recurrence of the disease, therefore the therapy was reintroduced. At the end of the observation time (571 days) the disease progressed. **A.** Before treatment. **B.** 1 month after treatment. **C.** 3 months after treatment.

4.2.5.3 Rezultati metronomske kemoterapije psov z epitelnimi tumorji

V skupini z epitelnimi tumorji je bilo vključenih 6/39 (15 %) psov. Pri 1/6 (17 %) je prišlo do popolnega odziva in regresije tumorja. V 3/6 (50 %) primerih smo dosegli stabilno bolezen. Zaradi tumorja so poginili 3/6 (50 %). Povprečen čas zdravljenja je bil 210 dni in povprečen čas opazovanja 228 dni (Tabela 8).

Slika 4 prikazuje odziv karcinoma pljuč na metronomsko kemoterapijo.

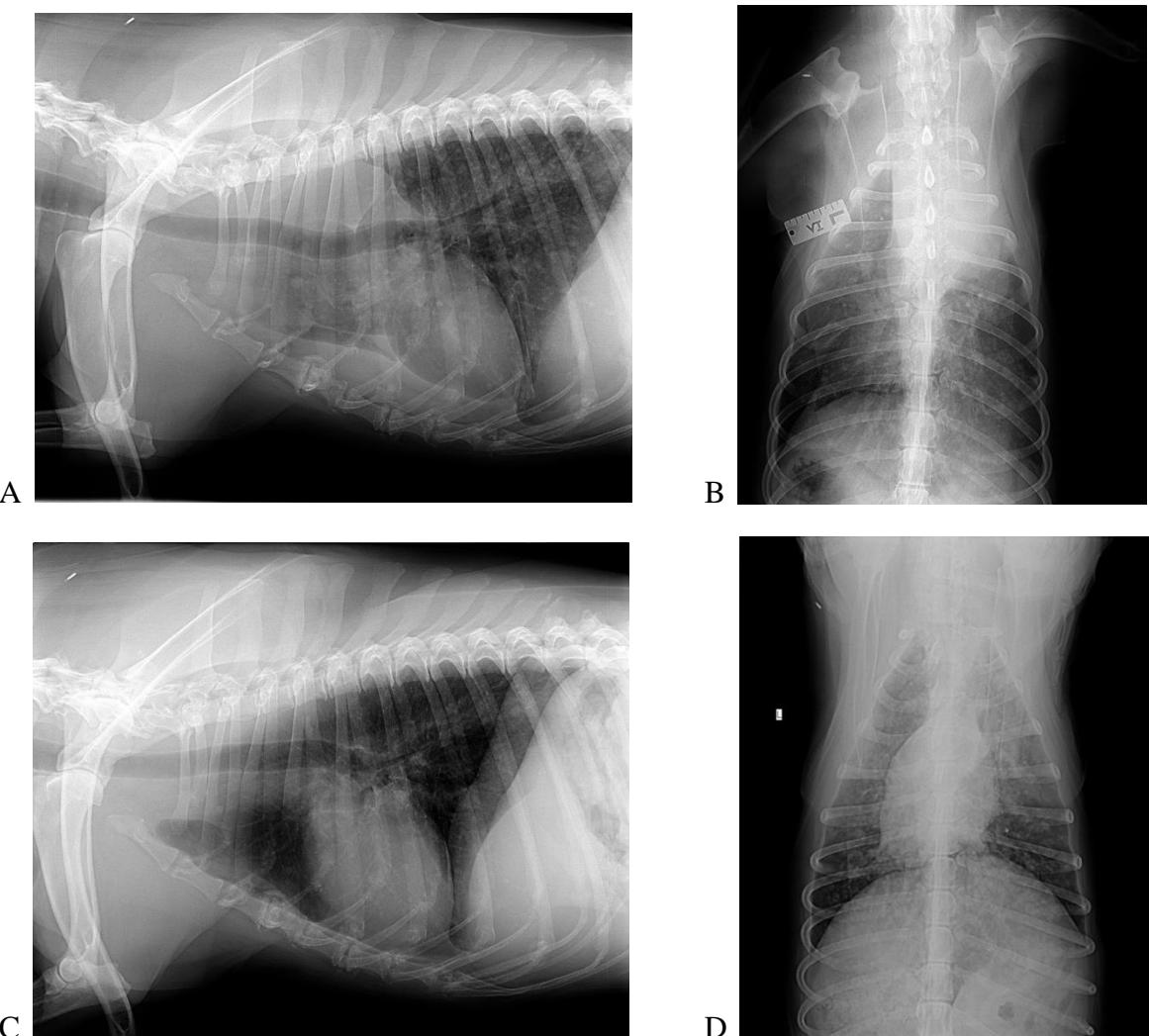
Tabela 8: Podatki o zdravljenju psov z epitelnimi tumorji

Table 8: Information about treatment of dogs with epithelial tumours

ZŠP	Tip tumorja	SHC	Čas zdravljenja (dni)	Čas opazovanja (dni)	RECIST
15	Karcinom prostate	ne	218	218*	PD
16	Karcinom	ne	231	231	SD
17	AC perianalnih žlez	ne	215	276	PD
22	Karcinom	ne	294	344*	CR
27	AC apokrinih žlez analnih vrečk	ne	196	196*	SD
28	Karcinom	ne	106	106	SD

Legenda: ZŠP = zaporedna številka psa, AC = adenokarcinom, SCC = ploščatocelični karcinom, SHC = sterilni hemoragični cistitis, RECIST = odgovor po 6 mesecih ali po koncu terapije, če se je ta zaključila prej kot v 6 mesecih, PD = napredovala bolezen, SD = stabilna bolezen, CR = popolni odziv, * = živ ob koncu opazovanega obdobja

Legend: ZŠP = serial number of a dog, AC = adenocarcinoma, SCC = squamous cell carcinoma, SHC = sterile hemorrhagic cystitis, RECIST = response evaluation criteria in solid tumours after 6 months or at the end of therapy if that ended before the 6-month period, PD = progressive disease, SD = stable disease, CR = complete response, * = alive at the end of observation period



Slika 4: Pes št. 28 z difuznim karcinomom pljuč. Odziv po 3 mesecih zdravljenja je bil SD (opazovalni čas 106 dni). A. Ob začetku zdravljenja (mediolateralna projekcija). B. Ob začetku zdravljenja (dorzoventralna projekcija). C. 1 mesec po začetku zdravljenja (mediolateralna projekcija). D. 3 mesece po začetku zdravljenja (dorzoventralna projekcija).

Figure 4: Dog no. 28 with diffuse lung carcinoma. Response 3 months after the treatment was SD (observation time 106 days). A. Before treatment (lateral projection). B. Before treatment (dorsoventral projection). C. 1 month after treatment (lateral projection). D. 3 months after treatment (dorsoventral projection).

4.2.5.4 Rezultati metronomske kemoterapije psov z oralnimi tumorji

Od skupno 7/39 (18 %) tumorjev so bili diagnosticirani 3 (43 %) sarkomi in 4 (57 %) karcinomi. Pri 3/7 (43 %) psih v tej skupini se je pojavil SHC. Pri 5/7 (71 %) je bil vzrok za evtanazijo oziroma pogin napredovali tumor. Pri nobenem psu ni prišlo do popolne regresije tumorja. Povprečen čas zdravljenja je bil 167 dni in povprečen čas opazovanja 235 dni (Tabela 9). Slike 5, 6 in 7 prikazujejo odziv treh oralnih tumorjev na metronomsko kemoterapijo.

Tabela 9: Podatki o zdravljenju psov z oralnimi tumorji

Table 9: Information about treatment of dogs with oral tumours

ZŠP	Tip tumorja	SHC	Čas zdravljenja (dni)	Čas opazovanja (dni)	RECIST
30	SCC	ne	418	637*	SD
31	SCC	ne	47	47	PD
33	FSA	da	209	337	PD
34	Sarkom/amelanotični melanom	da	90	191	SD
35	FSA	ne	135	162	PD
38	Karcinom	ne	70	70	PD
39	SCC	da	206	206	PD

Legenda: ZŠP = zaporedna številka psa, SCC = ploščatocelični karcinom, FSA = fibrosarkom, SHC = sterilni hemoragični cistitis, RECIST = odgovor po 6 mesecih ali po koncu terapije, če se je ta zaključila prej kot v 6 mesecih, PD = napredovala bolezen, SD = stabilna bolezen, *= živ ob koncu opazovanega obdobja

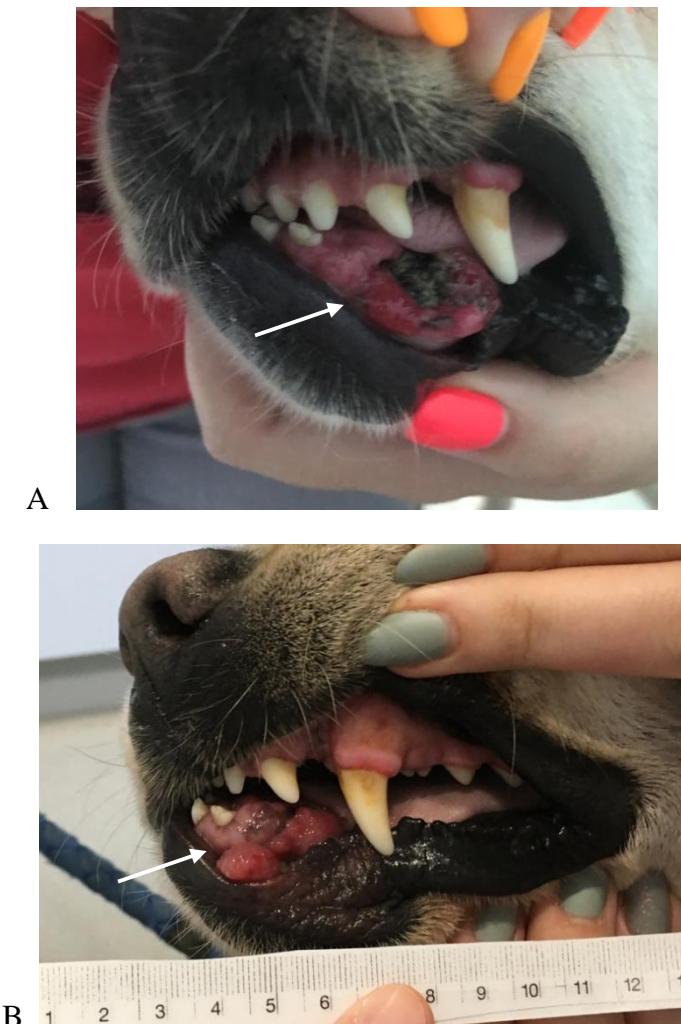
Legend: ZŠP = serial number of a dog, SCC = squamous cell carcinoma, FSA = fibrosarcoma, SHC = sterile hemorrhagic cystitis, RECIST = response evaluation criteria in solid tumours after 6 months or at the end of therapy if that ended before the 6-month period, PD = progressive disease, SD = stable disease, *= alive at the end of obersvation period

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.



Slika 5: Pes št. 30 s tonsilarnim ploščatoceličnim karcinomom (puščica). Odziv po 2 mesecih zdravljenja je bil CR. Po enem letu je prišlo do ponovitve bolezni, zato smo zdravljenje znova uvedli (opazovalni čas 637 dni). **A.** Ob začetku zdravljenja. **B.** 1 mesec po začetku zdravljenja. **C.** 2 meseca po začetku zdravljenja.

Figure 5: Dog no. 30 with tonsillar squamous cell carcinoma (arrow). Response 2 months after treatment was CR. After one year, the tumour recurred, so we reintroduced the treatment (observation time 637 days). **A.** Before treatment. **B.** 1 month after treatment. **C.** 2 months after treatment.



Slika 6: Pes št. 39 z oralnim ploščatoceličnim karcinomom (puščica). Pri tem psu smo začasno dosegli SD, vendar je odziv po 5 mesecih zdravljenja napredoval v PD (opazovalni čas 206 dni). **A.** Ob začetku zdravljenja. **B.** 5 mesecev po začetku zdravljenja.

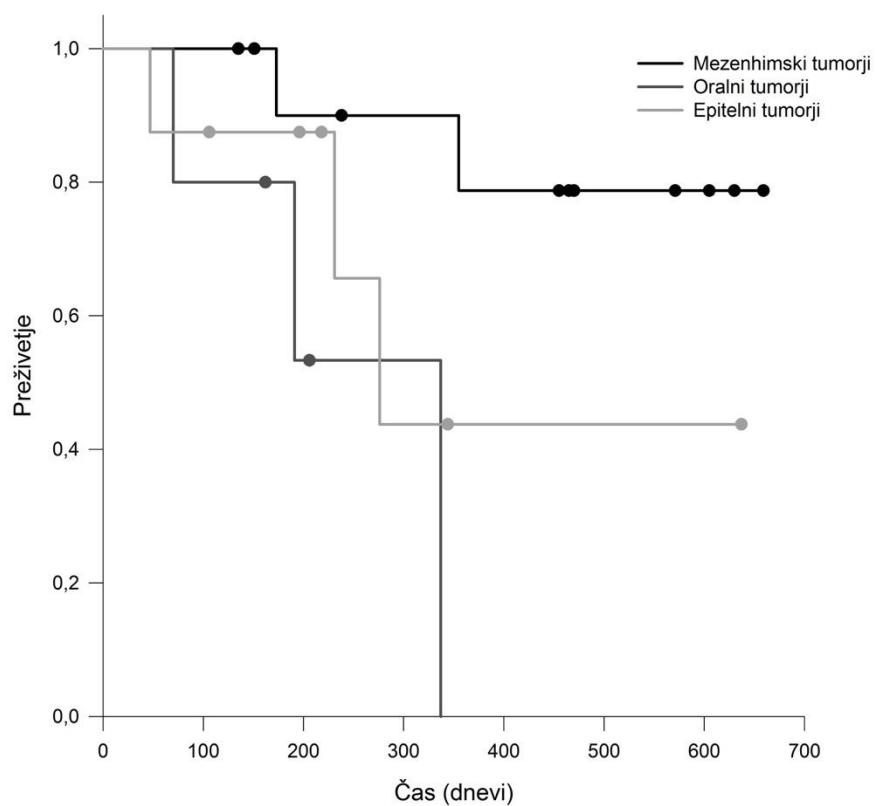
Figure 6: Dog no. 39 with oral squamous cell carcinoma (arrow). We managed to temporary achieve SD, but the disease progressed after 5 months of treatment (observation time 206 days). **A.** Before treatment. **B.** 5 months after treatment.

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.



Slika 7: Pes št. 33 z oralnim fibrosarkomom (puščica). Tudi pri tem psu smo začasno dosegli SD, vendar je odziv po 7 mesecih zdravljenja napredoval v PD (opazovalni čas 337 dni). **A.** Ob začetku zdravljenja. **B.** 3 mesece po začetku zdravljenja. **C.** 7 mesecev po začetku zdravljenja.

Figure 7: Dog no. 33 with oral fibrosarcoma (arrow). In this patient, we also managed to temporary achieve SD, although the disease progressed after 7 months of treatment (observation time 337 days). **A.** Before treatment. **B.** 3 months after treatment. **C.** 7 months after treatment.



Slika 8: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse glede na skupino tumorjev

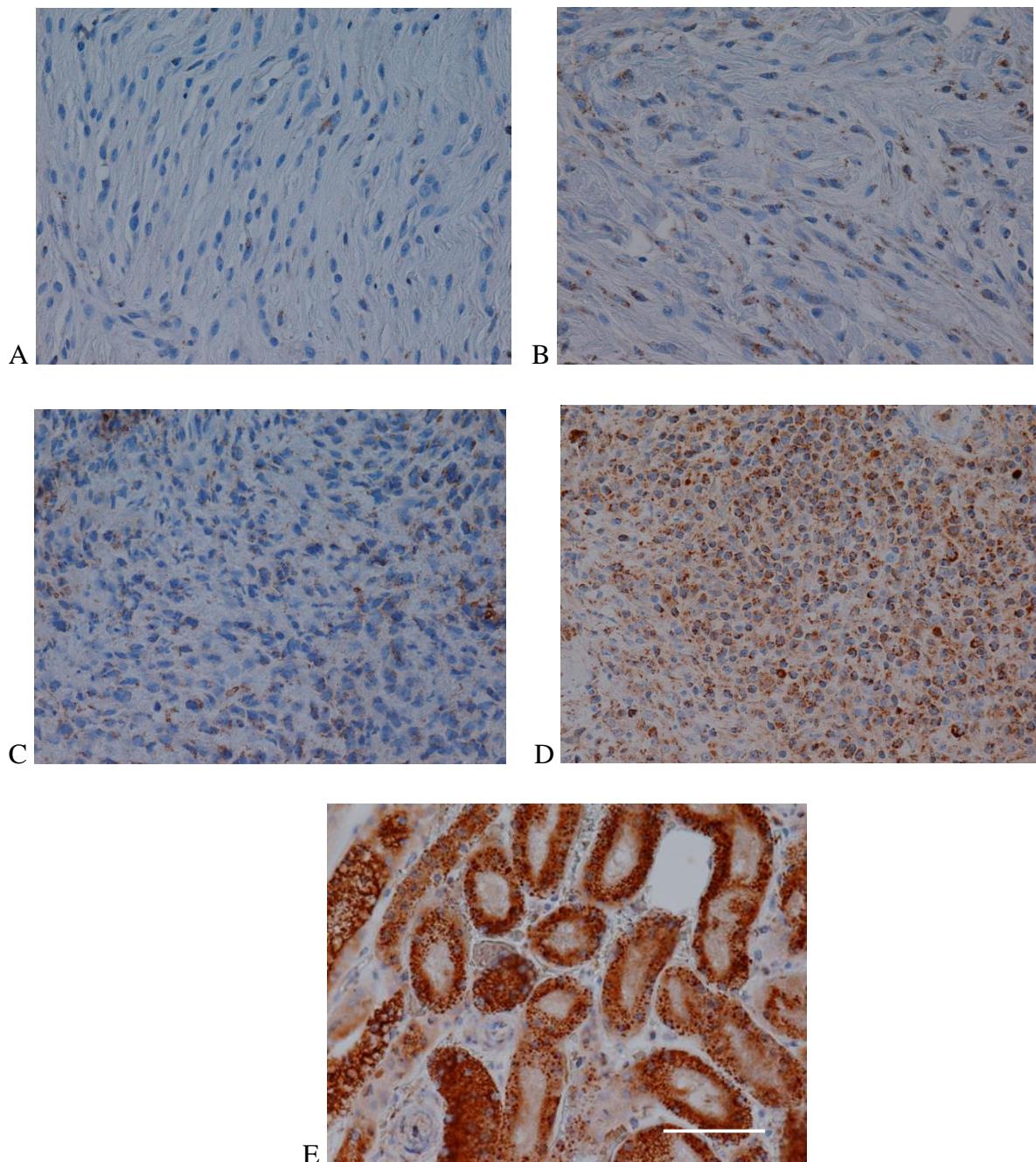
Figure 8: Kaplan-Meier survival plot for dogs according to the group of tumours

4.3 IMUNOHISTOKEMIČNA PREISKAVA

4.3.1 Izražanje VEGF

Izražanje VEGF smo ugotovili v 5/7 (71 %) mezenhimskih tumorjih in vseh treh epitelnih tumorjih (100 %) (Tabela 10). Raven izražanja VEGF je bila pri štirih mezenhimskih tumorjih VEGF 0, pri dveh mezenhimskih tumorjih VEGF 1 in VEGF 3, pri enem VEGF 2. Pri dveh epitelnih tumorjih je bila raven izražanja VEGF 1 in pri enem VEGF 3 (Slika 9). Pri vseh mezenhimskih tumorjih je bila jakost IHC reakcije šibka (ocena 1), pri epitelnih pa močna (ocena 2) (Tabela 10).

Statistična analiza ni pokazala značilnih razlik v seštevku ravni izražanju VEGF in jakosti imunohistokemične reakcije med epitelnimi in mezenhimskimi tumorji ($p = 0,462$).



Slika 9: Ravni izražanja vaskularnega endoteljskega rastnega faktorja glede na imunohistokemično označevanje. A. raven VEGF 0. B. raven VEGF 1. C. raven VEGF 2. D. raven VEGF 3. E. pozitivna kontrola. Merilo za A - E = 50 µm.

Figure 9: Imunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor. A. level VEGF 0. **B.** level VEGF 1. **C.** level VEGF 2. **D.** level VEGF 3. **E.** positive control. Bar for A – E = 50 µm.

V 8/10 (80 %) opazovanih primerov ne moremo določiti RECIST kriterija, saj so bili psi prekratek čas na terapiji ali pa psov ni bilo mogoče spremiljati.

Zaradi premajhnega števila primerov z rezultatom izražanja VEGF in oceno odziva po kriterijih RECIST, statistična analiza, s katero bi ovrednotili učinkovitost metronomske kemoterapije v povezavi z izražanjem VEGF, ni bila mogoča.

Tabela 10: Izražanje VEGF v povezavi z oceno po kriteriju RECIST

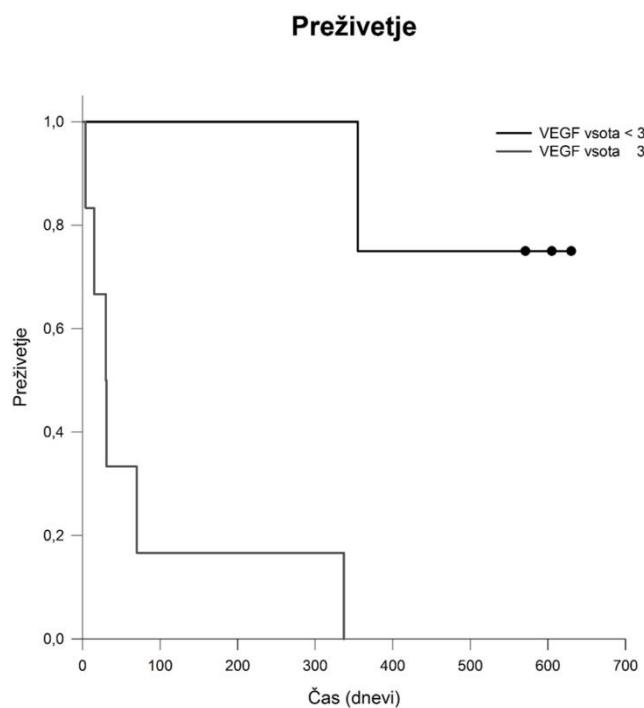
Table 10: Expression VEGF in connection with the evaluation by RECIST criteria

ZŠP	Tip tumorja	Izražanje VEGF			Ocena po kriterijih RECIST
		Raven izražanja VEGF (0 do 3)	Jakost IHC (1= šibka, 2= močna)	Seštevek ravni izražanja in jakosti IHC	
3	Mehkotkvivi sarkom	0	1	1	CR
6	Miksosarkom	0	1	1	PD
11	Nevrofibrosarkom	0	1	1	NP
12	Nevrofibrosarkom	0	1	1	PR
19	AC	1	2	3	premalo časa na terapiji
32	OM	3	2	5	premalo časa na terapiji
33	Oralni FSA	3	2	5	NP
36	OM/nevrofibrosarkom	1	2	3	premalo časa na terapiji
37	SCC	3	2	5	premalo časa na terapiji
38	Karcinom	1	2	3	NP

Legenda: ZŠP = zaporedna številka psa, AC= adenokarcinom, OM = oralni melanom, FSA= fibrosarkom, SCC = ploščatocelični karcinom, IHC = imunohistokemična reakcija, CR = popolni odziv, PD = napredovala bolezen, PR = delni odziv, NP = ni podatka

Legend: : ZŠP = serial number of a dog, AC= adenocarcinoma, OM = oral melanoma, FSA= fibrosarcoma, SCC = squamous cell carcinoma, IHC = imunohistochemical reaction, CR = complete response, PD = progressive disease, PR = partial response, NP = no data

Mediana vrednost seštevka ravni izražanja in jakosti IHC vseh opazovanih tumorjev je bila 3. Psi z nižjo ravnjo VEGF in nižjo jakostjo imunohistokemične reakcije VEGF (seštevek manj kot 3) imajo statistično značilno daljšo dobo preživetja kot psi, pri katerih je seštevek višji ali enak 3 ($p = 0,004$) (Slika 10).



Slika 10: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse glede na seštevek ravni izražanja VEGF in jakosti imunohistokemične reakcije

Figure 10: Kaplan-Meier survival plot for dogs according to the sum of VEGF expression and the intensity of imunolabelling

4.3.2 Gostota malih krvnih žil

Gostota malih krvnih žil je bila v mezenhimskih tumorjih statistično značilno višja kot v epitelnih tumorjih ($p = 0,012$). Gostota malih krvnih žil je bila v mezenhimskih tumorjih v povprečju $7,5 \pm 2,4$ in v epitelnih tumorjih $11,8 \pm 3,2$ (Tabela 11, Slika 11).

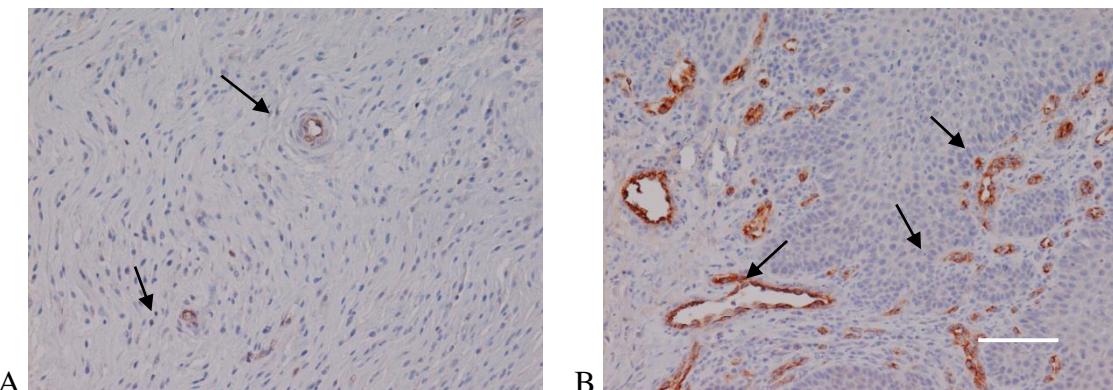
Tabela 11: Rezultati meritev gostote malih krvnih žil

Table 11: Results of microvessel density measurements

ZŠP	Tip tumorja	Izvorno tkivo	Gostota malih krvnih žil (X ± SD)	Ocena po kriterijih RECIST	Doba preživetja
3	Mehkotkvivi sarkom	M	$7,8 \pm 2,5$	CR	571
6	Mikosarkom	M	$9,3 \pm 1,6$	PD	355
11	Nevrofibrosarkom	M	$5,1 \pm 2,3$	NP	605
12	Nevrofibrosarkom	M	$3,9 \pm 1,4$	PR	630
19	AC	E	$13,4 \pm 4,3$	premalo časa na terapiji	30
32	OM	M	$12,6 \pm 2,4$	zdravljenje < 1 mesec	4
33	Oralni FSA	M	$6,3 \pm 1,5$	NP	337
36	OM/nevrofibrosarkom	M	$6,9 \pm 1,7$	premalo časa na terapiji	15
37	SCC	E	$11,7 \pm 7$	premalo časa na terapiji	31
38	Karcinom	E	$14,6 \pm 5,9$	NP	70

Legenda : ZŠP = zaporedna številka psa, AC = adenokarcinom, OM = oralni melanom, FSA = fibrosarkom, SCC = ploščatocelični karcinom, M = mezenhimski tip tumorja, E = epitelni tip tumorja, CR = popolni odziv, PD = napredovala bolezen, PR = delni odziv, NP = ni podatka

Legend: ZŠP = serial number of a dog, AC = adenocarcinoma, OM = oral melanoma, FSA = fibrosarcoma, SCC = squamous cell carcinoma, M = mesenchymal type of tumour, E = epithelial type of tumour, CR = complete response, PD = progressive disease, PR = partial response, NP = no data



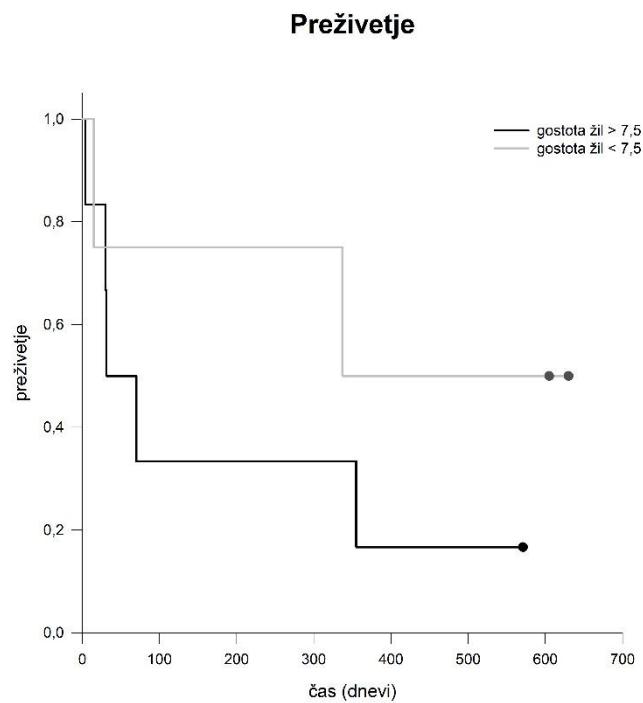
Slika 11: Imunohistokemično označevanje krvnih žil s protitelesom proti von Willebrandovemu faktorju.
A. Nizka gostota malih krvnih žil v mezenhimskem tumorju. **B.** Visoka gostota krvnih žil v epitelnem tumorju. Merilo za A in B = 100 µm. Puščice prikazujejo imunohistokemično označene male krvne žile.

Figure 11: Immunohistochemical detecting of blood vessels with anti-von Willebrand factor. A. Low microvessel density in mesenchimal tumour. B. High microvessel density in epithelial tumour. Bar for A and B = 100 µm. Arrows show immunohistochemically detected small blood vessels.

Zaradi premajhnega števila primerov z rezultatom gostote majhnih krvnih žil in oceno odziva po kriterijih RECIST, statistična analiza, s katero bi ovrednotili učinkovitost metronomske kemoterapije v povezavi z gostoto majhnih krvnih žil, ni bila mogoča.

Za epitelne tumorje ne moremo z gotovostjo reči, da obstaja korelacija med gostoto malih krvnih žil in kriteriji RECIST, saj so bili psi prekratek čas na metronomsko kemoterapijo ali nimamo opravljenih potrebnih meritev (Tabela 11).

Doba preživetja je bila daljša pri psih, ki so imeli tumor z nižjo gostoto malih krvnih žil (manjšo od 7,5), vendar razlika ni bila statistično značilna ($p = 0,339$) (Slika 12).



Slika 12: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse glede na gostoto malih krvnih žil

Figure 12: Kaplan-Meier survival plot for dogs according to microvessel density

5 RAZPRAVA

Namen raziskovalne naloge je bil preveriti varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije s ciklofosfamidom za zdravljenje različnih vrst tumorjev pri psih.

Dostopni literaturni podatki navajajo, da peroralni metronomski vnos citostatika ciklofosfamida z nizkimi minimalno toksičnimi odmerki, dlje časa, brez daljših obdobij prekinitev zdravljenja, deluje antiangiogeno in imunomodulatorno ter potencialno zaustavi rast tumorja. Zaradi izrazite angiogene sposobnosti nekaterih tumorjev je to potencialno učinkovit način zdravljenja, ki se osredotoča na zaviranje rasti tumorskega ožilja (3). V primerjavi s standardno kemoterapijo jo živali bolje prenašajo, potrebujejo manj podporne terapije, živalim pa povzročimo tudi manj stresa. Metronomsko kemoterapijo lahko kombiniramo z drugimi zdravili in drugimi načini zdravljenja (1). Uporabimo jo lahko kot terapijo prvega izbora (4, 5), kot dopolnilno terapijo standardni kemoterapiji, obsevanju ali kirurškem zdravljenju (4) in kot vzdrževalno terapijo, ki sledi primarnemu zdravljenju (5). V literaturi je malo podatkov o varnosti in učinkovitosti metronomske kemoterapije, zato so za uveljavitev v veterinarski onkologiji potrebne nadaljne raziskave (3).

Z namenom potrditve hipotez smo v klinično raziskavo vključili pse z različnimi tumorji, diagnosticiranimi s citološko in/ali histopatološko preiskavo, pri katerih so bile predhodne terapije neuspešne, niso bile mogoče ali so lastniki odklonili druge načine zdravljenja, ne glede na pričakovani izid zdravljenja. Pred začetkom zdravljenja smo opravili klinični pregled z določanjem kliničnega stadija bolezni (izbrane slikovne tehnike glede na tip in lokacijo tumorja: rentgensko slikanje, ultrazvočni pregled in računalniška tomografija) in opravili analizo izbranih laboratorijskih parametrov (krvna slika z diferencialno belo krvno sliko, koagulacijski profil in izbrani biokemični parametri v krvnem serumu). Zdravljenje pse smo nato spremljali mesečno, pri čemer smo ocenjevali lokalni in sistemski odziv na zdravljenje na osnovi preverjanja lokalnega odziva, kliničnega stadija bolezni in sprememb izbranih laboratorijskih parametrov. Neželene stranske učinke smo spremljali po veljavnih kriterijih Veterinary Cooperative Oncology Group (10).

V nalogi smo z imunohistokemično metodo preverili tudi izražanje VEGF in gostoto malih krvnih žil v vzorcih tumorjev pred zdravljenjem, z namenom oceniti, ali izražanje VEGF in

gostota malih krvnih žil vplivata na objektivni odziv tumorske bolezni na zdravljenje z metronomsko kemoterapijo s ciklofosfamidom.

V naši raziskavi smo preučevali različne tipe tumorjev, ki smo jih razdelili na 3 skupine: mezenhimske, epitelne in oralne tumorje. Metronomska kemoterapija se največkrat uporablja za zdravljenje spontanih solidnih tumorjev psov, kot so mehkotkivni sarkomi in hemangiosarkom (4, 7, 41), objavljene pa so tudi raziskave, kjer so preučevali učinkovitost te terapije pri različnih vrstah tumorjev, ki so vključevali tudi melanom, limfom, osteosarkom in karcinom prehodnega epitelija (2).

S klinično raziskavo pri psih s spontanimi tumorji različnega histološkega tipa smo potrdili, da je metronomska kemoterapija varna primarna ali adjuvantna metoda zdravljenja različnih rakavih obolenj psov. Razen SHC, ki se je pri psih v naši raziskavi pojavil pri 15 % zdravljenih psov, drugih neželenih stranskih učinkov nismo zaznali.

V študiji smo dokazali, da po 6 mesecih zdravljenja z metronomsko kemoterapijo lahko dosežemo vsaj minimalni odziv. Pri 52 % (13/25) psov smo tako dosegli vsaj stabilno bolezen.

Više in intenzivnejše izražanje VEGF in večja gostota malih krvnih žil v tkivih tumorjev pred zdravljenjem pomenita negativen prognostični dejavnik za zdravljenje pse, saj je doba preživetja pri teh statistično značilno krajsa.

5.1 VARNOST METRONOMSKE KEMOTERAPIJE

V raziskavi smo pri psih, zdravljenih z metronomsko kemoterapijo s ciklofosfamidom v kombinaciji s piroksikamom/meloksikamom ali metilprednizolonom v 15 % ugotovili pojav sterilnega hemoragičnega cistitisa. Naši rezultati so primerljivi z literurnimi podatki, kjer so v primeljivih raziskavah sterilnega hemoragičnega cistitisa ugotovili v 18 % (6, 7, 20, 48) oziroma 25 % (34) primerov. Klinični znaki, kot je hematurija in polakiurija so se v naši raziskavi pojavili po povprečno 129,5 dneh zdravljenja (od 63 do 245 dni). V raziskavi Harperja in sod. so se klinični znaki sterilnega hemoragičnega cistitisa pojavili v povsem primerljivem obdobju, 110 dni po začetku zdravljenja (47). Z namenom izboljšanja kliničnega stanja, smo zdravljenje začasno prekinili in ga nadaljevali po tem, ko so znaki popolnoma izzveneli (praviloma za 1 - 2 tedna). Poleg tega lahko možnost pojava sterilnega

hemoragičnega cistitisa zmanjšamo tudi z aplikacijo zdravila zjutraj, da žival po zaužitju kemoterapevtika čim več pije in posledično pogosteje urinira (3).

Drugih, v literaturi opisanih neželenih stranskih učinkov v naši raziskavi nismo zaznali. Pri nobenem psu se ni pojavila anemija, ki jo kot možni stranski učinek navajajo v raziskavah (49, 50). Vsi spremeljani laboratorijski parametri (hematoloških, biokemičnih in koagulacijskih preiskav) so bili pri vseh psih in pri vseh odvzemih v mejah referenčnih vrednosti Diagnostičnega laboratorija na Kliniki za male živali.

V naši raziskavi nismo zazanali stranskih učinkov na gastrointestinalni sistem, kot so bruhanje in driska, ki so se v raziskavi Harperja in sod. pojavili pri 19 % zdravljenih psov (47).

5.2 ODGOVOR NA ZDRAVLJENJE Z METRONOMSKO KEMOTERAPIJO IN DOBA PREŽIVETJA PRI PSIH Z RAZLIČNIMI SPONTANIMI TUMORJI

Z metronomsko kemoterapijo s ciklofosfamidom v odmerku nad $12,5 \text{ mg/m}^2/24 \text{ ur}$ najmanj 6 mesecev dosežemo objektivni odziv na zdravljenje in sicer vsaj stabilizacijo bolezni ter statistično značilno podaljšamo dobo preživetja pri različnih vrstah rakavih obolenj pri psih.

Po oceni lastnikov, se je pri večini zdravljenih psov splošno stanje izboljšalo ali pa je ostalo nespremenjeno. Večinoma so opisovali izboljšano odzivnost in ohranjanje ješčnosti.

Skupaj smo po 6 mesecih zdravljenja pri 16 % (4/25) psov dosegli popolni odziv (CR), pri 8 % (2/25) delni odziv (PR), pri 28 % (7/25) pa je bolezen mirovala (SD). Pri 48 % psov (12/25) je bolezen napredovala (PD). Cilj MK je vsaj mirovanje bolezni (2). Objektivni odgovor, ki ga pri metronomski terapiji pričakujemo tako vključuje pse s CR, PR in SD, smo v naši raziskavi dosegli pri 52 % (13/25) psov. Marchettijeva in sod. so v podobni raziskavi na 15 psih z različnimi tipi tumorjev dosegli vsaj stabilno bolezen le pri 40 % psov (10). Razlika v odzivu v naši raziskavi je lahko posledica predvsem različnih tipov in velikosti tumorjev.

Najboljši odziv smo pričakovano dosegli pri psih z mezenhimskimi tumorji. Pri 25 % (3/12) smo dosegli popolni odziv, pri 17 % (2/12) delni odziv, pri prav tako 17 % (2/12) stabilizacijo bolezni, pri 41 % (5/12) pa je bolezen napredovala.

Nekoliko slabši odziv smo dosegli pri psih z epitelnimi tumorji, pri katerih smo le pri 17 % (1/6) dosegli popolni odziv, pri 50 % (3/6) stabilizacijo bolezni, pri 33 % (2/6) pa je bolezen napredovala.

Najslabše so se na zdravljenje odzvali psi z oralnimi tumorji, pri katerih smo po 6 mesecev po začetku zdravljenja dosegli stabilizacijo bolezni le pri 29 % (2/7), pri 71 % (5/7) pa je bolezen napredovala.

Z iskanjem v spletnih bazah (PubMed, Science Direct) s ključnimi besedami »metronomska kemoterapija, povprečna dobra preživetja, psi, tumorji« avgusta 2020 nismo našli raziskav, ki bi navajale podatke o povprečni dobi preživetja psov s posameznimi tipi tumorjev, zdravljenih z metronomsko kemoterapijo.

Preostalih 14 psov smo izključili iz raziskave, saj so bili v raziskavo vključeni že v terminalnem stadiju obolenja, zaradi česar so bili zdravljeni manj kot mesec dni.

Povprečna doba preživetja psov, ne glede na tip tumorja, ki so bili v raziskavi do zaključka, je bila 324 dni (od 47 do 659 dni).

Najdaljšo povprečno dobo preživetja smo izračunali pri psih z mehkotkivnimi sarkomi, nato pri psih s karcinomi, psi z oralnimi tumorji pa so imeli najkrajšo povprečno dobo preživetja.

V naši raziskavi je bila pri psih z mezenhimskimi tumorji povprečna doba preživetja 434 dni (od 173 do 659 dni), kar je primerljivo z rezultati iz raziskave, v katero je bilo vključenih 30 psov z mehkotkivnim sarkomom in pri katerih so dosegli povprečno dobo preživetja 410 dni (20). V raziskavi, v kateri je bila metronomska kemoterapija adjuvanta terapija obsevanju mehkotkivnih sarkomov psov, je bila povprečna doba preživetja 757 dni, kar je znatno daljše kot pri psih, ki so bili samo obsevani. Pri njih je bila povprečna doba preživetja le 286 dni (19). O daljni povprečni dobi preživetja poročajo tudi v raziskavi, v katero je bilo vključenih 18 psov s hemangiosarkomom vranice. Pri 9 psih, zdravljenimi z metronomsko kemoterapijo in etopsidom ter piroksikamom, je bila povprečna doba preživetja in čas prost bolezni 178 dni, pri 9 psih, zdravljenih s standardno kemoterapijo, pa je bila povprečna doba preživetja le 133 dni, čas prost bolezni pa 126 dni (6). Za razliko od prej naštetih raziskav pa so v raziskavi na psih s hemangiosarkomom vranice dokazali, da dodatek metronomske kemoterapije h kirurški odstranitvi vranice in standardni kemoterapiji ne podaljša povprečne dobe preživetja (51).

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

Povprečna doba preživetja pri psih z epitelnimi tumorji je bila 210 dni (od 47 do 637 dni), pri psih z oralnimi tumorji pa 235 dni (od 47 do 637 dni).

Po podatkih iz raziskave, v kateri so karcinome mlečne žleze zdravili s kirurško odstranitvijo in adjuvanto metronomsko kemoterapijo ter talidomidom, je bila povprečna doba preživetja več kot eno leto. Pri psicah, katerim so le kirurško odstranili tumorje pa je bila povprečna doba preživetja samo 150 dni (50).

Z iskanjem v spletnih bazah nismo našli raziskav, ki bi navajale podatke o povprečni dobi preživetja psov z oralnimi tumorji, zdravljenimi z metronomsko kemoterapijo.

5.3 VPLIV IZRAŽANJA VEGF IN GOSTOTE MALIH KRVNIH ŽIL NA ODZIV NA ZDRAVLJENJE IN DOBO PREŽIVETJA

Ker je eden izmed glavnih mehanizmov metronomske kemoterapije antiangiogeno delovanje, smo žeeli preveriti, ali izražanje VEGF v tumorju vpliva na odgovor na zdravljenje z metronomsko kemoterapijo. Raziskav, v katerih bi z imunohistokemijo vrednotili izražanje VEGF kot napovednega dejavnika za odziv na zdravljenje z metronomsko kemoterapijo, v veterinarski medicini po naših podatkih še ni.

V raziskavi na psih z zasevki različnih spontanih tumorjev smo zasledili podatke o spremljanju plazemskega VEGF. Ugotovili so, da je nižja bazalna vrednost VEGF v plazmi ($\leq 63 \text{ pg/mL}$) povezana z daljšo povprečno dobo preživetja (3,91 meseca). Pri višji bazalni vrednosti VEGF v plazmi ($> 63 \text{ pg/mL}$) je bila povprečna dobra preživetja 1,67 meseca (10).

V raziskavah iz humane onkologije pa zasledimo podatke o spremljanju serumskega VEGF tekom zdravljenja z metronomsko kemoterapijo. Medtem ko so v nekaterih raziskavah ugotovili znižanje vrednosti VEGF po zdravljenju (52, 53), v drugih raziskavah tega niso potrdili (54, 55, 56). Prav tako v veterinarski medicini ne zasledimo podatka o gostoti malih krvnih žil kot napovednemu dejavniku za odziv na zdravljenje z metronomsko kemoterapijo, v predkliničnih in kliničnih raziskavah iz humane medicine pa so, podobno kot pri VEGF, vrednotili gostoto malih krvnih žil tekom zdravljenja z IHC. Rezultati raziskav kažejo, da je

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

po zdravljenju z metronomsko kemoterapijo gostota malih krvnih žil nižja kot pred zdravljenjem (53, 54, 57, 58).

Rezultati raziskave kažejo, da je povprečna doba preživetja psov daljša pri nižjem izražanju VEGF in pri nižji gostoti majhnih krvnih žil v tumorju. Povprečna doba preživetja psov s tumorjem z nižjim izražanjem VEGF (seštevek ravni izražanja in jakosti IHC manj kot 3) je bila 561,25 dni, medtem ko je bila povprečna doba preživetja psov z višjim izražanjem VEGF 337 dni.

Pri 4/10 (40 %) psih z mezenhimskimi tumorji (nevrofibrosarkom in mikrosarkom), v katerih smo določili nizko izražanje VEGF (seštevek manj kot 3), smo tudi ob koncu raziskave zabeležili popolni ali delni odziv. Najvišje so VEGF (skupni seštevek 5) izražali SCC, OM in oralni FSA, pri katerih je kmalu po začetku terapije prišlo do pogina ali evtanazije. Pri SCC po 4 dneh, pri OM po 31 dneh, pri oralnem FSA pa po 337 dneh. Srednje izražanje (seštevek 3) se je pojavilo pri AC, karcinomu visoke stopnje malignosti in nevrofibrosarkomu. Vsi trije psi so poginili ali bili evtanazirani v obdobju od 15 do 70 dni. Glede na rezultate lahko kljub majhnemu številu preiskovanih živali in tumorjev sklepamo, da je nižje izražanje VEGF v tumorjih povezano z boljšim odzivom na metronomsko kemoterapijo in daljšim preživetjem.

Lahko tudi sklepamo, da je izražanje VEGF bolj verjetno pri epitelnih kot pri mezenhimskih tumorjih, a ne moremo trditi z zagotovostjo, saj je bilo število preiskovanih primerov premajhno. Za bolj natančne ugotovitve, bi morali z IHC metodo preučiti več različnih tumorjev ter morda vzorce vzeti v različnih stadijih zdravljenja z metronomsko kemoterapijo.

Primerljivih podatkov v literaturi nismo našli.

6 SKLEPI

- Metronomska kemoterapija je varna metoda zdravljenja različnih rakavih obolenj psov. Najpogosteji neželeni stranski učinek metronomske kemoterapije je sterilni hemoragični cistitis, ki se je v naši raziskavi pojavil pri 15 % zdravljenih psov. Drugih neželenih stranskih učinkov nismo ugotovili.
- Z metronomsko kemoterapijo s ciklofosfamidom v odmerku $12,5 \text{ mg/m}^2/24 \text{ ur}$ smo po 6 mesecih zdravljenja, dosegli želeni odziv - vsaj stabilizacijo bolezni - pri 52 % (13/25) psih.
- Višje izražanje VEGF in višja gostota malih krvnih žil v tumorjih sta negativna prognostična dejavnika, saj je pri teh psih doba preživetja statistično značilno krajsa kot pri psih z nižjim izražanjem VEGF in nižjo gostoto malih krvnih žil.

7 ZAHVALA

Na začetku bi se radi zahvalili mentorici prof. dr. Nataši Tozon in somentorici doc. dr. Tanji Švara. Raziskovalna naloga ne bi bila takšna kot je brez asist. Nine Milevoj. Iskrene zahvale vsem za deljenje znanja in usmerjanje, s pomočjo česar je ta raziskovalna naloga dobila svojo končno obliko.

Velika zahvala gre tudi osebju Diagnostičnega laboratorija Klinike za male živali VF UL in Inštituta za patologijo, divjad, ribe in čebele VF UL za vse opravljene preiskave ter potrpežljivost pri zbiranju in pripravi vzorcev.

Zahvaljujeva se tudi prof. dr. Alenki Nemec Sveti za podatke o laboratorijskih preiskavah krvi.

Posebna zahvala je namenjena celotnemu osebju Klinike za male živali VF UL, ki vključuje tudi receptorje, ki so nama pomagali pri iskanju kartotek in zbiranju podatkov.

8 LITERATURA

1. Mutsaers AJ. Antiangiogenic and metronomic therapy. In: Whithrow SJ, Vail DM, Page RL. Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. 5th ed. London : Elsevier, 2013: 229–34.
2. Biller B. Metronomic chemotherapy in veterinary patients with cancer: rethinking the targets and strategies of chemotherapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2014; 44: 817–29.
3. Gaspar TB, Henriques J, Marconato L, Queiroga FL. The use of low-dose metronomic chemotherapy in dogs - insight into a modern cancer field. *Vet Compar Oncol* 2018; 16: 2–11.
4. Marconato L, Ruess-Melzer K, Buchholz J, Kaser-Hotz B. New concepts in human oncology: is it possible to adopt them in veterinary medicine as well? *Schweiz Arch Tierheilkd* 2011; 153(8): 351–61.
5. Nguyen SM, Thamm DH, Vail DM, London CA. Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1. 0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet Comp Oncol* 2015; 13(3): 176–83.
6. Lana S, U'ren L, Plaza S, et al. Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy of splenic hemangiosarcoma in dogs. *J Vet Intern Med* 2007; 21(4): 764–9.
7. Elmslie RE, Glawe P, Dow SW. Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. *J Vet Intern Med* 2008; 22(6): 1373
8. Burton JH, Mitchell L, Thamm DH, Dow SW, Biller BJ. Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. *J Vet Intern Med* 2011; 25(4): 920–6.
9. Tripp CD, Fidel J, Anderson CL, et al. Tolerability of metronomic administration of lomustine in dogs with cancer. *J Vet Intern Med* 2011; 25(2): 278-84.
10. Marchetti V, Giorgi M, Fioravanti A, et al. First-line metronomic chemotherapy in a

- metastatic model of spontaneous canine tumours: a pilot study. *Invest New Drugs* 2012; 30(4): 1725–30.
11. Leach TN, Childress MO, Greene SN, et al. Prospective trial of metronomic chlorambucil chemotherapy in dogs with naturally occurring cancer. *Vet Comp Oncol* 2012; 10(2): 102-12.^[1]
 12. Mitchell L, Thamm DH, Biller BJ. Clinical and immunomodulatory effects of toceranib combined with low-dose cyclophosphamide in dogs with cancer. *J Vet Intern Med* 2012; 26(2): 355-62.
 13. Schrempp DR, Childress MO, Stewart JC, et al. Metronomic administration of chlorambucil for treatment of dogs with urinary bladder transitional cell carcinoma. *J Am Vet Med Assoc* 2013; 242(11): 1534-8.
 14. Spugnini EP, Buglioni S, Carocci F, et al. High dose lansoprazole combined with metronomic chemotherapy: a phase I/II study in companion animals with spontaneously occurring tumors. *J Transl Med* 2014; 12(1): 1-10.
 15. Bracha S, Walshaw R, Danton T, Holland S, Ruaux C, Obradovich J. Evaluation of toxicities from combined metronomic and maximal tolerated dose chemotherapy in dogs with osteosarcoma. *J Small Anim Pract* 2014; 55(7): 369-74.
 16. London CA, Gardner HL, Mathie T, et al. Impact of toceranib/piroxicam/cyclophosphamide maintenance therapy on outcome of dogs with appendicular osteosarcoma following amputation and carboplatin chemotherapy: a multi-institutional study. *PLoS One* 2015; 10(4): e0124889.
 17. Wendelburg KM, Price LL, Burgess KE, Lyons JA, Lew FH, Berg J. Survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy with or without adjuvant chemotherapy: 208 cases (2001–2012). *J Am Vet Med Assoc* 2015; 247(4): 393-403.
 18. Rasmussen RM, Kurzman ID, Biller BJ, Guth A, Vail DM. Phase I lead-in and subsequent randomized trial assessing safety and modulation of regulatory T cell numbers following a maximally tolerated dose doxorubicin and metronomic dose cyclophosphamide combination chemotherapy protocol in tumour-bearing dogs. *Vet Comp Oncol* 2015; 15(2): 421-30.

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

19. Cancedda S, Marconato L, Meier V et al. Hypofractionated radiotherapy for macroscopic canine soft tissue sarcoma: a retrospective study of 50 cases treated with a 5×6 gy protocol with or without metronomic chemotherapy. *Vet Radiol Ultrasound* 2016; 57(1): 75–83.
20. Finotello R, Henriques J, Sabattini S, et al. A retrospective analysis of chemotherapy switch suggests improved outcome in surgically removed, biologically aggressive canine haemangiosarcoma. *Vet Comp Oncol* 2017; 15(2): 493–503.
21. Folkman J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS* 2004; 112(78): 496–507.
22. Penel N, Adenis A, Bocci G. Cyclophosphamide-based metronomic chemotherapy: after 10 years of experience, where do we stand and where are we going? *Crit Rev Oncol Hematol* 2012; 82(1): 40–50.
23. Benazzi C, Al-Dissi A, Chau CH, et al. Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology. *Sci World J* 2014; 2014: e919570 (16 str.) doi: 10.1155/2014/919570
24. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438(7070): 967–74.
25. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11): 835–45.
26. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; 307(5706): 58-62.
27. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 417–27.
28. Goel S, Duda DG, Xu L, et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev* 2011; 91(3): 1071–121.
29. Shaked Y, Henke E, Roodhart JML, et al. Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell* 2008; 14(3): 263–73.

30. Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6(10): 569–79.
31. Suvannasankha A, Fausel C, Julian BE, et al. Final report of toxicity and efficacy of a phase II study of oral cyclophosphamide, thalidomide, and prednisone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a Hoosier oncology group trial, HEM01-21. *Oncologist* 2007; 12(1): 99–106.
32. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(6): 423–36.
33. Blansfield JA, Caragacianu D, Alexander HR, et al. Combining agents that target the tumor microenvironment improves the efficacy of anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14(1): 270–80.
34. Choisunirachon N, Jaroensong T, Yoshida K, et al. Effects of low-dose cyclophosphamide with piroxicam on tumour neovascularization in a canine oral malignant melanoma-xenografted mouse model. *Vet Comp Oncol* 2015; 13(4): 424–32.
35. Bertolini F, Paul S, Mancuso P, et al. Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer Res* 2003; 63(15): 4342–6.
36. Loven D, Hasnis E, Bertolini F, Shaked Y. Low-dose metronomic chemotherapy: from past experience to new paradigms in the treatment of cancer. *Drug Discov Today* 2013; 18(34): 193–201.
37. Mross K, Steinbild S. Metronomic anti-cancer therapy: an ongoing treatment option for advanced cancer patients. *J Cancer Ther Res* 2012; 1(Dec): e32.
38. Denies S, Cicchelero L, de Rooster H, et al. Immunological and angiogenic markers during metronomic temozolamide and cyclophosphamide in canine cancer patients. *Vet Comp Oncol* 2016; 15(2): 594-605.
39. Drevs J, Schneider V. The use of vascular biomarkers and imaging studies in the early clinical development of anti-tumour agents targeting angiogenesis. *J Intern Med* 2006; 260(6): 517–29.

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

40. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4 +CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(5): 641–8.
41. Ribatti D. Cancer stem cells and tumor angiogenesis. *Cancer Lett* 2012; 321(1): 13–7.
42. Beck B, Driessens G, Goossens S, et al. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* 2011; 478(7369): 399–403.
43. Pasquier E, Kavallaris M, André N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7(8): 455–65.
44. Rozados VR, Sánchez AM, Gervasoni SI, Berra HH, Matar P, Scharovsky OG. Metronomic therapy with cyclophosphamide induces rat lymphoma and sarcoma regression, and is devoid of toxicity. *Ann Oncol* 2004; 15(10): 1543–50.
45. Santos AAF, Oliveira JT, Lopes CCC, et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 2010; 143(4):268–75.
46. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(11):834–46.
47. Harper A, Blackwood L. Toxicity of metronomic cyclophosphamide chemotherapy in a UK population of cancer-bearing dogs: a retrospective study. *J Small Anim Pract* 2017; 58(4): 227–30.
48. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6): 401–10.
49. Matsuyama A, Woods JP, Mutsaers AJ. Evaluation of toxicity of a chronic alternate day metronomic cyclophosphamide chemotherapy protocol in dogs with naturally occurring cancer. *Can Vet J* 2017; 58(1): 51–5.
50. De Campos CB, Lavalle GE, Monteiro LN, et al. Adjuvant thalidomide and metronomic chemotherapy for the treatment of canine malignant mammary gland neoplasms. *In Vivo* 2018; 32(6): 1659-66.

51. Alexander CK, Cronin KL, Silver M, Gardner HL, London C. The addition of metronomic chemotherapy does not improve outcome for canine splenic haemangiosarcoma. *J Small Anim Pract* 2019; 60: 32-7.
52. Zeng J, Yang L, Huang F, et al. The metronomic therapy with prednisone, etoposide, and cyclophosphamide reduces the serum levels of VEGF and circulating endothelial cells and improves response rates and progression-free survival in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016; 78(4): 801–8.
53. Guo L, Zhou F, Wei W, et al. Anti-angiogenesis effect of metronomic chemotherapy in multiple myeloma patients. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2012; 33(6): 457–60.
54. Murakami H, Ogata Y, Agaki Y, Ishibashi N, Shirouzu K. Circulating endothelial progenitor cells in metronomic chemotherapy using irinotecan and/or bevacizumab for colon carcinoma: study of their clinical significance. *Exp Ther Med* 2011; 2(4): 595–600.
55. Pramanik R, Tyagi A, Agarwala S, Vishnubhatla S, Dhawan D, Bakhshi S. Evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and thrombospondin-1 as biomarkers of metronomic chemotherapy in progressive pediatric solid malignancies. *Indian Pediatr* 2020; 57(6): 508–11.
56. El-Arab LR, Swellam M, El Mahdy MM. Metronomic chemotherapy in metastatic breast cancer: impact on VEGF. *J Egypt Natl Canc Inst* 2012; 24(1): 15–22.
57. Woo JY, Yang SH, Lee YS, Lee SY, Kim J, Hong YK. Continuous low-dose temozolomide chemotherapy and microvessel density in recurrent glioblastoma. *J Korean Neurosurg Soc* 2015; 58(5): 426-31.
58. Ferdous T, Harada K, Kin T, Harada T, Ueyama Y. Efficacy of schedule-dependent metronomic S-1 chemotherapy in human oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2013; 43(1): 271-9.

9 PRILOGE

Priloga 1: Rezultati posameznih krvnih parametrov glede na posameznega vključenega psa v raziskavi

Legenda: št.pacienta = zaporedna številka psa, 1m po = 1 mesec po začetku zdravljenja, 3m po = 3 mesece po začetku zdravljenja, 6m po = 6 mesecov po začetku zdravljenja, CR = popoln odziv, »prazen prostor« = ni podatkov oz. smo prej zaključili s terapijo

WBC ($5,2 - 13,9 \times (10^9/L)$)

ŠT.pacienta	Pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	16.53	7.97	CR	
2	8.82	7.24	10.14	9.67
		11.74	10.72	7.2
3		7.3	11.1	8.38
4	9.7	8.58	9.58	
5	9.73	9.37		
6	7.25		5.38	4.87
7	7.57	5.18	4.73	4.65
8	7.78	5.89	5.99	
11				
12		8.14	6.95	
13		11.39	7.66	
14	10.57	13.74	25	
15	15.03	7.81	6.28	8.55
16	10.99	5.65	6.17	
17	6.58	8.44	6.83	6.46
	15.27	8.05	7.18	7.32
22	7.4	10.71	6.56	
27	9.32			
28	7.77			
30	6.73	6.36	5.82	
31				
33	8.12	7.26	6.69	5.6
34	7.28	6.84		
35	12.78	12.94		
38	7.63	8.5		
39	12.71	10.46		

RBC ($5,7 - 8,8 \times (10^{12}/L)$)

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1		7.2	6.99	
2		7.32	6.22	6.86
		6.47	6.99	6.95
3		6.39	6.34	5.62
4	6.43	6.41	6.64	
5	6.92	7.51		
6	7.41		7.48	7.08
7	5.57	5.32	6.1	5.77
8	5.5	5.7	6.25	
11				
12			6.96	6.32
13			8.89	8.25
14	5.92	5.88	4.11	
15	6.92	6.74	6.81	6.5
16	6.5	6.44	6.18	
17	5.45	6.19	5.96	6.1
	5.26	5.61	5.33	5.43
22	6.03	5.41	4.94	
27	5.66			
28	6.74			
30	9.07	7.78	7.65	
31				
33	7.49	7.22	6.19	6.5
34	7.54	7.31		
35	7.38	7.45		
38	5.89	6.35		
39	5.69	6.15		

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

HGB (129 - 184 (g/L))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	170	165		
2	167	151	169	167
		158	169	173
3		160	163	141
4	159	158	172	
5	162	177		
6	175		181	180
7	146	127	156	143
8	130	139	148	
11				
12		163	150	
13		194	185	
14	128	134	94	
15	159	157	165	157
16	151	150	147	
17	123	137	139	138
	128	138	139	135
22	153	137	126	
27	122			
28	163			
30	192	179	176	
31				
33	186	182	157	159
34	171	172		
35	157	162		
38	142	192		
39	133	146		

HCT (0,37 - 0,57 (L/L))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
		0.5	0.49	
2		0.52	0.44	0.47
			0.47	0.51
3			0.45	0.45
4		0.45	0.46	0.46
5		0.49	0.53	
6		0.52		0.55
7		0.4	0.39	0.44
8		0.38	0.4	0.43
11				
12			0.49	0.45
13			0.57	0.55
14		0.37	0.38	0.27
15		0.47	0.47	0.48
16		0.43	0.43	0.42
17		0.36	0.41	0.4
		0.37	0.4	0.4
22		0.42	0.4	0.37
27		0.35		
28		0.47		
30		0.56	0.51	0.51
31				
33		0.52	0.5	0.45
34		0.51	0.51	
35		0.46	0.47	
38		0.43	0.45	
39		0.38	0.42	

MCV (58,8 - 71,2 (fL))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	69.7	69.9		
2	70.6	70.8	68.3	68.5
		72	73	76
3		70.9	71.6	73.6
4	69.6	71.6	72.1	
5	70.3	71		
6	70.6		73.7	73.2
7	72.7	73.9	71.9	75.2
8	69.6	70.5	68.7	
11				
12		70	71.4	
13		64.5	67.1	
14	63	64.6	66.2	
15	68.6	69.5	70.8	68.7
16	65.6	66.9	67.8	
17	65.4	65.8	66.8	67.3
	70.1	72	75.4	73.8
22	70.2	73.5	74.8	
27	62			
28	69.3			
30	61.5	65.9	67	
31				
33	69.6	69.7	72.6	71.6
34	68	69.6		
35	62.5	63.5		
38	72.9	70.1		
39	67.5	67.5		

MCH (20,5 - 24,2 (pg))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
		23.6	23.6	
2		22.8	24.3	24.7
			24.4	24.2
3			25	25.7
4		24.7	24.7	26
5		23.5	23.5	
6		23.6		24.2
7		26.2	23.9	25.5
8		23.6	24.4	23.7
11				
12			23.4	23.7
13			21.8	22.4
14		21.7	22.8	23
15		22.9	23.3	24.2
16		23.3	23.3	23.8
17		22.5	22.1	23.3
		24.4	24.7	26
22		25.4	25.2	25.6
27		21.6		
28		24.1		
30		21.1	23.1	23
31				
33		24.8	25.2	25.4
34		22.7	23.5	
35		21.3	21.8	
38		24.1	30.3	
39		23.3	23.7	

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

MCHC (310 - 362 (g/L))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
2	338	337		
2	323	343	361	351
		339	331	328
3		353	359	341
4	355	345	360	
5	334	332		
6	334		329	348
7	361	323	355	330
8	338	346	345	
11				
12		335	332	
13		338	334	
14	344	352	347	
15	334	336	342	352
16	355	348	351	
17	344	336	349	336
		348	343	345
22	361	343	342	
27	348			
28	348			
30	343	350	343	
31				
33	356	362	350	341
34	334	338		
35	341	343		
38	331	432		
39	346	350		

CHCM (310 - 357 (g/L))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
		336	337	
2	346	344	362	350
		344	353	341
3		359	361	351
4	360	358	342	
5	351	346		
6	345		344	350
7	344	337	358	322
8	351	347	351	
11				
12			342	338
13			340	338
14	345	351	346	
15	350	344	348	356
16	362	348	350	
17	342	352	352	346
		346	342	341
22	360	353	349	
27	339			
28	347			
30	363	356	352	
31				
33	365	364	356	356
34	346	342		
35	353	346		
38	326	330		
39	354	351		

CH (20,5 - 24,2 (pg))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	23,4	23,5		
2	24,4	24,2	24,7	23,9
		24,7	25,7	25,8
3		25,4	25,8	25,8
4	25	25,5	24,5	
5	24,6	24,5		
6	24,3		25,3	25,5
7	25	24,8	25,7	24,1
8	24,4	24,4	24	
11				
12		23,9	24,1	
13		21,8	22,6	
14	21,6	22,6	22,8	
15	24	23,9	24,6	24,4
16	23,7	23,2	23,6	
17	22,3	23,1	23,5	23,2
		24,2	24,5	25,7
22	25,2	25,9	26	
27	20,9			
28	24			
30	22,3	23,3	23,6	
31				
33	25,4	25,3	25,8	25,5
34	23,5	23,7		
35	22	21,9		
38	23,7	23,1		
39	23,8	23,7		

RDW (11,9 - 14,5 (%))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
		12	13	
2		12,8	13,6	12,9
			12,2	12,6
3			12,7	12,5
4	13,8	14,8	13	
5	11,8	11,8		
6	12,2		13,6	13,3
7	13,8	14,7	13,1	13,7
8	13,8	14,2	14,5	
11				
12			13,4	13
13			13,9	14,2
14	16,7	17	14,9	
15	12,7	14,4	13,4	13,2
16	13,8	13,9	15,5	
17	13,3	123,7	12,9	13,6
		11,8	13,2	12,2
22	12,2	13,4	12,8	
27	12,8			
28	12,6			
30	14,1	14,8	12,9	
31				
33	12,9	13,6	14	13,3
34	12,9	13,5		
35	14,1	13,8		
38	12,9	14		
39	13,1	13,6		

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

HDW (14 - 21 (g/L))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	15.7	16.3		
2	16.5	18.1	17.7	18.7
		17.3	17.5	15.5
3		17.5	17.7	17.1
4	18.3	19.8	17.2	
5	16.1	16.2		
6	16.5		15.3	16.4
7	17	16.8	18.4	20
8	19.6	17.9	17.8	
11				
12		15.5	16.1	
13		20.5	21	
14	22.1	21.2	23.8	
15	17.6	19.2	17.7	17.7
16	21.5	19.4	20.1	
17	17.1	17.2	16.4	18.1
	16.5	15.7	16	16.5
22	17	17.4	15.5	
27	18.9			
28	18.6			
30	21.8	21.1	18.5	
31				
33	17.5	17.9	18.7	15.7
34	21	18.5		
35	20.1	20.3		
38	21.1	19.5		
39	17.8	17.2		

PLT (143,3 – 400 x (10⁹/L))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
		263	310	
2	336	302	296	271
			192	228
3			220	200
4	407	366	342	
5	369	192		
6	331		291	176
7	618	231	205	293
8	250	179	157	
11				
12			319	265
13			348	315
14	63	69	60	
15	305	294	233	246
16	176	261	229	
17	486	434	328	543
	282	263	276	250
22	203	261	365	
27	195			
28	84			
30	238	234	223	
31				
33	361	291	239	293
34	191	166		
35	336	367		
38	561	910		
39	309	402		

MPV (7 - 11 (fL))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	10.2	9.7		
2	9.2	9.5	9.4	10
		10.9	10.5	10.3
3		10	9.7	10.6
4	8.7	9.4	9.3	
5	11.9	8.9		
6	10.9		8.8	9.8
7	10.2	9.8	14.4	13.1
8	15.5	16	14.5	
11				
12		9.9	8.9	
13		10.2	9.6	
14	26.5	25.6	23.4	
15	10.5	11.4	10.7	10.2
16	10.8	11.8	10.3	
17	12.1	11.8	10.2	10.7
	10.6	8.8	10.7	9.3
22	10	10.6	10.3	
27	11.3			
28	12			
30	10.9	9.7	9.6	
31				
33	12.2	12.1	10.9	10.7
34	9.3	9.5		
35	9.1	9.4		
38	12.7	11		
39	8.3	9.6		

PCT (0,1 - 0,4 (%))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
		0.27	0.3	
2	0.31	0.29	0.28	0.27
		0.21	0.24	0.22
3		0.22	0.19	0.22
4	0.35	0.35	0.32	
5	0.44	0.17		
6	0.36		0.26	0.27
7	0.63	0.23	0.3	0.38
8	0.39	0.29	0.23	
11				
12			0.32	0.24
13			0.35	0.3
14	0.17	0.18	0.14	
15	0.32	0.34	0.25	0.25
16	0.19	0.31	0.24	
17	0.59	0.51	0.39	0.58
	0.3	0.23	0.29	0.23
22	0.2	0.28	0.38	
27	0.22			
28	0.1			
30	0.26	0.23	0.21	
31				
33	0.44	0.35	0.26	0.32
34	0.18	0.16		
35	0.31	0.34		
38	0.71	1		
39	0.26	0.39		

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

%NEUT (42,5 - 77,3 (%))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	73.6	68.3		
2	65.3	65.7	72.8	73.1
		72	72.5	66.7
3		71.7	57.8	76.9
4	77	73.5	75.4	
5	62.1	61.1		
6	69		61.7	68.3
7	71.7	60.2	55.7	64.2
8	58	55.7	57.8	
11				
12		68.8	71.2	
13		84	77.2	
14	58.1	65	73.1	
15	83.6	77	77	78.6
16	49	56.4	57.6	
17	67.4	62.2	69.7	68.2
	75.3	58.8	66.2	57.4
22	58.1	70.1	65.4	
27	81.7			
28	76.4			
30	52.6	57.6	51.4	
31				
33	65.8	61.5	67.4	6.3
34	76.2	79.9		
35	71.3	63.3		
38	57.2	59.2		
39	61	56.2		

%LYMPH (11,8 - 39,6 (%))

ŠT.pacienta	pr.začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	14.5	22.1		
2	21.3	24.1	16.8	16.1
		17.1	17.4	22
3		19.2	16.1	13.3
4	13	15.8	13	
5	28.1	29		
6	20.9		24	23.7
7	16.3	23.3	30.8	24.7
8	26.2	29.2	30	
11				
12		20.6	19	
13		7.8	11.3	
14	33.6	26.2	19.9	
15	10.3	16.3	16.8	13.3
16	30.1	30.8	30.5	
17	16.7	19	17.4	16.7
	12.5	24.4	19.7	19.4
22	27.5	13.1	16.2	
27	10.2			
28	16.1			
30	32.7	29.6	32.9	
31				
33	25.1	24.5	24.8	25.7
34	15.1	12.3		
35	15	13.3		
38	26.4	27.7		
39	25.2	31.9		

%MONO (3,3 - 10,3 (%))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	5.1	5.4		
2	6.7		5.2	5.3
		4.6	3.8	4.5
3		4.8	4.7	4.9
4	3.4	3.7	3.3	
5	3.4	3.3		
6	5.6		9.4	4.7
7		5.2	5.6	5.5
8	6.3	4.7	5.6	
11				
12		3.2	2.7	
13		5.1	4.4	
14	3.9	3.8	4.7	
15	4.9	5.1	4.4	6.1
16	4.2	5.9	4.4	
17	4.9	5.1	5.7	7.7
	8	4.9	5.8	4.5
22	5.6	5.6	4.8	
27	6.8			
28	4.9			
30	4.7	4.3	5.2	
31				
33	3.6	3.2	2.2	3.3
34	5.7	6		
35	4.2	3.6		
38	7.4	6.6		
39	6.6	5.4		

%EOS (0 - 7,0 (%))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
		6.5	3.9	
2		6.2		4.9 5.2
			6	5.9 6.4
3			4	21 4.2
4		6.3	6.7	7.9
5		5.8	6	
6		4.2		4.8 3
7			11.1	7.5 5.3
8		9.1	10.1	6.1
11				
12			7.4	6.9
13			2.9	6.7
14		3.9	4.4	1.8
15		0.8	1.4	1.5 1.8
16		16.5	6.8	7.3
17		10.8	13.5	7 7
		3.9	11.7	8.2 18.5
22		8.4	11	13.2
27		0.6		
28		2.2		
30		9.3	7.5	9.6
31				
33		5.3	10.2	5.3 6.3
34		2.6	1.3	
35		9.1	19.6	
38		8.7	5.4	
39		6.7	6	

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

%BASO (0 - 1,3 (%))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	0.1	0.1		
2	0.2		0.1	0.1
		0.2	0.2	0.1
3		0.1	0.2	0.1
4	0.1	0.1	0.2	
5	0.3	0.3		
6	0.1	0.1		0.2
7		0	0	0
8	0.3	0.1	0.2	
11				
12		0.1	0	
13		0.2	0.3	
14	0	0.1	0.1	
15	0.2	0.2	0.1	0.1
16	0.1	0.1	0.1	
17	0.1	0.1	0	0.1
	0	0.1	0.1	0.1
22	0.1	0.1	0.1	
27	0			
28	0.2			
30	0.2	0.3	0.3	
31				
33	0.1	0.1	0.1	0.2
34	0.2	0.1		
35	0.1	0.1		
38	0.1	0.4		
39	0.1	0.1		

%LUC (0 - 3,0 (%))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
		0.2	0.2	
2	0.3		0.1	0.2
			0	0.1
3			0.2	0.3
4		0.2	0.1	0.1
5		0.3	0.3	
6		0.1		0.1
7			0.2	0.2
8		0.1	0.2	0.2
11				
12			0	0.1
13			0.1	0.1
14		0.5	0.5	0.4
15		0.2	0.2	0.1
16		0.2	0.1	0.1
17		0.1	0.1	0.1
		0.3	0.1	0
22		0.3	0.1	0.3
27		0.7		
28		0.2		
30		0.5	0.6	0.7
31				
33		0.2	0.4	0.1
34		0.3	0.4	
35		0.4	0.1	
38		0.2	0.7	
39		0.4	0.5	

#NEUT (3,9 - 8,0 x (10⁹/L))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	12.17	5.44		
2	5.76		7.38	7.07
		8.46	7.77	4.8
3		5.23	6.41	6.44
4	7.47	6.31	7.22	
5	6.05	5.73		
6	5		3.32	3.32
7		3.12	2.75	2.98
8	4.52	3.28	3.47	
11				
12		5.6	4.95	
13		9.57	5.92	
14	6.14	8.93	18.29	
15	12.55	6.01	4.83	6.72
16	5.39	3.18	3.55	
17	4.44	5.25	4.76	4.41
	11.5	4.73	4.75	4.2
22	4.3	7.51	4.29	
27	7.62			
28	5.94			
30	3.54	3.67	2.99	
31				
33	5.34	4.46	4.51	3.6
34	5.55	5.46		
35	9.11	8.19		
38	4.37	4.86		
39	7.76	5.88		

#LYMPH (1,3 - 4,1 x (10⁹/L))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
		2.39	1.76	
2		1.88		1.7
			2.01	1.87
3			1.4	1.78
4		1.26	1.36	1.25
5		2.74	2.71	
6		1.52		1.29
7			1.21	1.16
8		2.04	1.72	1.8
11				
12			1.67	1.32
13			0.89	0.86
14		3.55	3.6	4.99
15		1.55	1.27	1.06
16		3.3	1.74	1.88
17		1.1	1.06	1.19
		1.91	1.96	1.41
22		2.03	1.4	1.06
27		0.95		
28			1.25	
30		2.2	1.88	1.91
31				
33		2.04	1.78	1.66
34		1.1	0.84	
35		1.92	1.72	
38		2.01	2.27	
39		3.2	3.34	

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

#MONO (0,2 - 1,1 x (10⁹/L))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	0.84	0.43		
2	0.59		0.53	0.52
		0.55	0.41	0.32
3		0.35	0.52	0.41
4	0.33	0.32	0.31	
5	0.33	0.31		
6	0.41		0.5	0.23
7		0.21	0.24	0.25
8	0.49	0.28	0.34	
11				
12		0.26	0.19	
13		0.58	0.34	
14	0.41	0.53	1.18	
15	0.74	0.4	0.27	0.52
16	0.46	0.33	0.27	
17	0.32	0.43	0.39	0.5
	1.22	0.4	0.42	0.33
22	0.41	0.6	0.32	
27	0.63			
28	0.38			
30	0.32	0.28	0.3	
31				
33	0.29	0.23	0.15	0.18
34	0.41	0.41		
35	0.54	0.46		
38	0.56	0.54		
39	0.84	0.57		

#EOS (0 - 7,0 (%))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
		1.08	0.31	
2		0.54		0.5 0.5
			0.7	0.63 0.46
3			0.29	2.33 0.35
4		0.61	0.58	0.76
5		0.57	0.57	
6		0.31		0.26 0.15
7			0.57	0.3 0.25
8		0.7	0.59	0.37
11				
12			0.6	0.48
13			0.33	0.51
14		0.41	0.6	0.44
15		0.13	0.11	0.1 0.15
16		1.81	0.38	0.45
17		0.71	1.14	0.48 0.45
		0.6	0.94	0.59 1.35
22		0.62	1.18	0.87
27		0.05		
28		0.17		
30		0.62	0.48	0.56
31				
33		0.43	0.74	0.35 0.35
34		0.19	0.09	
35		1.16	2.54	
38		0.67	0.44	
39		0.85	0.63	

#BASO (0 - 0,1 x (10⁹/L))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	0.01	0.01		
2	0.02		0.01	0.01
		0.02	0.03	0.01
3		0.01	0.02	0.01
4	0.01	0.01	0.02	
5	0.02	0.02		
6	0.01		0	0.01
7		0	0.01	0
8	0.02	0	0.01	
11				
12		0.01	0	
13		0.02	0.02	
14	0	0.01	0.01	
15	0.03	0.01	0.01	0.01
16	0.01	0.01	0.01	
17	0.01	0.1	0	0.1
	0	0.01	0	0
22	0.01	0.01	0.01	
27	0			
28	0.02			
30	0.01	0.02	0.02	
31				
33	0.1	0.01	0.01	0.01
34	0.01	0.01		
35	0.01	0.1		
38	0.01	0.03		
39	0.01	0.01		

#LUC (0 - 0,3 x (10⁹/L))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
		0.03	0.02	
2		0.03		0.01 0.02
			0	0.01 0.02
3			0.01	0.03 0.04
4		0.02	0.01	0.02
5		0.03	0.03	
6		0.01		0 0.01
7			0.01	0.01 0.01
8		0	0.01	0.01
11				
12			0	0.01
13			0.01	0.01
14		0.05	0.07	0.1
15		0.02	0.01	0.01 0.01
16		0.02	0.01	0.01
17		0.01	0.1	0.01 0.2
		0.05	0.01	0 0.01
22		0.02	0.01	0.02
27		0.06		
28		0.02		
30		0.03	0.04	0
31				
33		0.1	0.03	0.01 0.01
34		0.02	0.03	
35		0.05	0.2	
38		0.02	0.06	
39		0.05	0.05	

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

PT (6,3 - 8,7 (s))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
		7.6		
2	7.3		7.2	7.1
		8	7.6	7.4
3		7	7.1	7.9
4	6.3	7.4	7.1	
5		7.2		
6	7.7		7.8	7.4
7		7.5	7.4	7.8
8	8.9	8.8	8.3	
11				
12		9.4	6.7	
13		6.4	7.2	
14	8.2	8	8.3	
15	7.5	6.4	7.5	7
16	7	7.3		
17	7.9	7.9	7.5	6.7
		7.5	9.1	8.3
22	7.8	7.8	7.2	
27	6.7			
28	11.5			
30	7.4	8.1		
31				
33	8.1	7.9	8.2	8.7
34	7.5	7.9		
35	7	5.5		
38	4.7	7.6		
39	6.6	7.4		

APTT (10,4 - 15,5 (s))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
			13.5	
2	14.3		14.5	12.5
			12.9	13.5
3			12.4	12.3
4	10.9	14.7	14.5	
5			14.2	
6	13		12.7	13.3
7			14.4	13.9
8	14.5	14.8	13.8	
11				
12			13.1	13.2
13			12.2	10.6
14	13.2	12.4	12.7	
15	12.9	14.3	16.5	13.2
16	11	12.2		
17	13.7	13.8	13.2	12.2
			13.1	14.4
22	12.9	12.5	14.6	
27		12.5		
28		16.3		
30	12.1	11.5		
31				
33	11.5	12.4	12.2	12.6
34	14.2	11.1		
35	13.4	14.6		
38	14.2	14.4		
39	12.1	13		

SEČNINA (2,5 - 9,6 (mmol/L))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	6.8	5.56		
2	6.3		14.18	10.75
			7.6	6.91
3		7.16	7.8	3.73
4	3.32	6.93	12.32	
5	6.2	7.14		
6	4.13		6.52	5.65
7				6.46
8	6.1	3.85	5.1	
11				
12		8.1	8.4	
13		9.1	5.88	
14	4.98	12.22	10.98	
15	3.5	4.27	3.46	3.44
16	5.5	6.35	6.86	
17	17.8	14.4	10.1	14.12
	4.08	13.6	14.83	14
22	11	19.03	12.33	
27	2.86			
28	6.49			
30	6.64	8.91	8.04	
31				
33	6.28	4.64	4.73	4.3
34	6.33	10.3		
35	9.78	7.14		
38	2.8			
39	5.84	6.14		

KREATININ (44,2 - 132,6 (µmol/L))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	61.2	67		
2	80.5		99.38	89.83
			74.8	82.95
3		77.61	81.3	71.25
4	87.38	98.15	56.48	
5	115.7	111.39		
6	99.7		101.62	104.38
7				103.66
8	100.5	109.67	115.9	
11				
12		100.7	87.2	
13		93.4	94.52	
14	55.51	129.7	110.76	
15	104.1	92	97.26	68.6
16	62.3	57	47.95	
17	166.98	137.79	99.96	113.46
	90.65	124.9	131.48	84.81
22	122.4	127.14	142.73	
27	59.93			
28	69.62			
30	65.62	91.4	79.73	
31				
33	66.8	60.83	75.78	82.85
34	93.17	85.4		
35	73.1	73.94		
38	71.5			
39	91.52	102.45		

U. Bergant Bertoncelj, E. Župec: Varnost in učinkovitost metronomske kemoterapije ... rakavih obolenj psov
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Raziskovalna naloga.

AP (85 - 224 (< 1 leto); 20 - 156 (U/L) (> 1 leto))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	32.3	28.7		
2	57.2		36.9	35.5
		15.2	18.4	11.3
3		11.2	10.1	19.9
4	42.7	31.6	35.3	
5 /		46.5		
6	37.3		36.6	25.1
7			35.2	28
8	33.6	36	32.2	
11				
12		77.1	66.6	
13		35.3	35.2	
14	116.1	130.1	238.5	
15	117	109	119.3	115.7
16	90.6	172	109.4	
17	316.3	75.3	53.6	70.4
	100.5	48.2	37.8	39.7
22	56.4	30.1	50.7	
27	71.1			
28	27.4			
30	22.7	18.8	17.5	
31				
33	52.2	36.7	27.6	51.6
34	185.1	209.6		
35	142.8	107.2		
38	434.5			
39	14.6	20.4		

ALT (21 - 148 (U/L))

ŠT.pacienta	pred začetkom	1m po	3m po	6m po
1				
	46	61.5		
2	211.9		37.9	49
		58.9	89.6	103.9
3		95.5	89.3	80.9
4	53.8	59.2	36.4	
5	25.9	30.3		
6	37		35.8	25.1
7			43	36.8
8	45.9	40.8	37.5	
11				
12		56.7	62.3	
13		71.5	68.4	
14	34.7	47	57	
15	104.2	73	64.8	61.9
16	63.5	72	79.1	
17	53.6	28.1	26.4	20.3
	19.4	45.3	45.3	43.4
22	109.7	46	44.8	
27		33.8		
28		31.8		
30	167.7	130.2	106.9	
31				
33	90.9	72.2	50.4	63.3
34	160.2	128		
35	40.9	36.8		
38	216			
39	32.3	32.7		