



Nina Milevoj

**VREDNOTENJE POSTOPKOV
ELEKTROKEMOTERAPIJE IN GENSKEGA
ELEKTROPRENOSA PLAZMIDNE DNA Z ZAPISOM
ZA PASJI INTERLEVINK-12 PRI ZDRAVLJENJU
SPONTANIH KOŽNIH IN ORALNIH TUMORJEV PRI
PSIH**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2020



UDK 636.7.09:616.5-006+616.31-006:615.84:615.277.3:615.37:616-036(043.3)

Nina Milevoj, dr. vet. med.

**VREDNOTENJE POSTOPKOV ELEKTROKEMOTERAPIJE
IN GENSKEGA ELEKTROPRENOSA PLAZMIDNE DNA Z
ZAPISOM ZA PASJI INTERLEVINK-12 PRI ZDRAVLJENJU
SPONTANIH KOŽNIH IN ORALNIH TUMORJEV PRI PSIH**

Doktorska disertacija

**EVALUATION OF THE PROCEDURES OF
ELECTROCHEMOTHERAPY AND GENE
ELECTROTRANSFER OF PLASMID DNA ENCODING
CANINE INTERLEUKIN-12 FOR THE TREATMENT OF
SPONTANEOUS CUTANEOUS AND ORAL TUMOURS IN
DOGS**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2020

Nina Milevoj

Vrednotenje postopkov elektrokemoterapije in genskega elektroprenosa plazmidne DNA z zapisom za pasji interlevkin-12 pri zdravljenju spontanih kožnih in oralnih tumorjev pri psih

Delo je bilo opravljeno na:

- Kliniki za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani
- Onkološkem inštitutu Ljubljana, Oddelku za eksperimentalno onkologijo
- Institutu Jožefa Stefana, Odseku za znanosti o okolju

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentorica: prof. dr. Nataša Tozon

Izjava o delu

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Tanja Švara

Član: prof. dr. Andrej Cör

Član: prof. dr. Robert Frangež

Članica: doc. dr. Darja Pavlin

IZVLEČEK

Ključne besede: bleomicin – kri – farmakokinetika – terapevtska uporaba; bolezni psov – terapija z zdravili – imunologija – patologija; neoplazme – kri – terapija z zdravili; elektrokemoterapija – veterinarska; interlevkin-12 – imunologija – terapevtska uporaba; imunoterapija – veterinarska; kakovost življenja; psi

Namen doktorske naloge je bil vrednotenje postopkov elektrokemoterapije (EKT) in genskega elektroprenosa (GEP) plazmidne DNA z zapisom za pasji interlevkin-12 (IL-12) pri zdravljenju spontanih kožnih in oralnih tumorjev pri psih. S tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS), smo določili koncentracijo bleomicina (BLM) v krvi zdravljenih psov in izračunali farmakokinetične parametre. V krvi zdravljenih psov smo določali subpopulacije imunskega celica (CD4+ in CD8+ limfociti, regulatorni limfociti T – T_{reg}) s pretočno citometrijo. Z imunohistokemičnim barvanjem smo določali izražanje receptorjev in ligandov programirane celične smrte 1 (PD-1 in PD-L1) v tumorjih zdravljenih psov. Da bi ocenili kakovost življenja psov, zdravljenih z EKT in/ali GEP IL-12, smo njihove lastnike povabili k izpolnjevanju Vprašalnika o kakovosti življenja psov in Kratkega testa za ocenjevanje vprašalnika. BLM pri psih je imel monofazno eliminacijsko krivuljo. Povprečni porazdelitveni volumen (Vd) je bil $224,5 \pm 75,02$ ml/kg, očistek (CL) $7,04 \pm 2,05$ ml/min/kg in razpolovni čas ($t_{1/2}$) $22,03 \pm 0,88$ min. Telesna masa psov ni vplivala na farmakokinetiko BLM. Starejši psi so imeli nižji Vd, na druge farmakokinetične parametre pa starost ni vplivala. Tekom zdravljenja nismo ugotovili značilnih razlik v odstotku CD4+ in CD8+ limfocitov v krvi zdravljenih psov. Ob koncu opazovalnega obdobja je upadel odstotek T_{reg} v krvi zdravljenih psov; spremembe niso sovpadale z odgovorom na zdravljenje. PD-1 je izražalo 95,2 % mastocitomov in 100 % oralnih melanomov, PD-L1 pa so izražali vsi tumorji. Psi s tumorji z višjim izražanjem PD-1 in PD-L1 so imeli značilno krajevno povprečni čas preživetja, slabši odgovor na zdravljenje in krajevno preživetje brez napredovanja bolezni kot tisti s tumorji z nizkim izražanjem PD-1 in PD-L1. Lastniki so ocenili, da se je kakovost življenja psov po zdravljenju izboljšala. Bolje so ocenili kakovost življenja pri psih, zdravljenih z neinvazivno vrsto zdravljenja, pri tistih, ki so se na zdravljenje odzvali, in pri tistih z manjšimi ter s kožnimi/podkožnimi tumorji. Rezultati doktorske naloge so pomembni za izboljšanje protokolov in napovedovanje odgovora na zdravljenje z EKT in/ali GEP IL-12.

ABSTRACT

Key words: bleomycin – blood – pharmacokinetics – therapeutic use; dog diseases – drug therapy – immunology – pathology; neoplasms – blood – drug therapy; electrochemotherapy – veterinary; interleukin-12 – immunology – therapeutic use; immunotherapy – veterinary; quality of life; dogs

The aim of this doctoral dissertation was to evaluate the procedures of electrochemotherapy (ECT) and gene electrotransfer (GET) of plasmid DNA encoding canine interleukin-12 (IL-12) for the treatment of spontaneous cutaneous and oral tumours in dogs. We determined the pharmacokinetic properties of bleomycin (BLM) in the blood of the treated dogs using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (LC-MS/MS) and calculated the pharmacokinetic parameters. In the blood of the treated dogs, we determined the lymphocyte subpopulations (CD4+ and CD8+ lymphocytes, regulatory T cells – T_{reg}) by flow cytometry. Immunohistochemical staining was employed to evaluate the expression of programmed cell death-1 and its ligands (PD-1 and PD-L1) in the tumours of the treated dogs. The owners of the treated dogs were offered the Cancer treatment form and Owner minitest to evaluate the quality of life of the dogs after treatment with ECT and/or IL-12 GET. The results showed that BLM had a monophasic elimination curve. The mean volume of distribution (V_d) was 224.5 ± 75.02 ml/kg, clearance (CL) 7.04 ± 2.05 ml/min/kg and elimination half-life ($t_{1/2}$) 22.03 ± 0.88 min. The body weight of the dogs did not affect any of the pharmacokinetic parameters. Older dogs had lower V_d ; however, the age of the dogs did not affect other pharmacokinetic parameters. No significant differences in CD4+ and CD8+ lymphocyte counts were observed during treatment. At the end of the observation period, the percentage of T_{reg} in the blood of treated dogs decreased; the change did not correlate with the treatment response. PD-1 was expressed by 95% of mast cell tumours and 100% of oral malignant melanomas, and PD-L1 was expressed by all tumours. The dogs who had tumours with higher PD-1 and PD-L1 expression had shorter mean survival times, poorer treatment response and shorter progression-free survival than those who had tumours with lower PD-1 and PD-L1 expression. The owners assessed that the quality of their dogs' lives improved after treatment. The assessment was better in dogs that were treated with noninvasive treatments, those that responded to the treatment and those with smaller and cutaneous/subcutaneous tumours. The results of this doctoral dissertation are important for protocol optimization and prediction of the response to treatment with ECT and/or IL-12 GET.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK.....	4
ABSTRACT.....	5
KAZALO VSEBINE.....	6
KAZALO SLIK.....	10
KAZALO TABEL.....	12
SEZNAM OKRAJŠAV.....	13
1 UVOD.....	15
1.1 NAMEN	17
1.2 HIPOTEZE.....	17
2 PREGLED LITERATURE.....	18
2.1 RAKAVA OBOLENJA PRI PSIH	18
2.1.1 Vloga pasjih modelov v translacijskih raziskavah.....	18
2.2 ELEKTROPORACIJA	20
2.2.1 Elektrokemoterapija.....	20
2.2.1.1 Cisplatin	22
2.2.1.2 Bleomicin	23
2.2.2 Genski elektroprenos IL-12.....	25
2.3 RAK IN IMUNSKI ODZIV	28
2.3.1 Vloga imunskega sistema pri tumorskih obolenjih.....	28
2.3.2 Celice T pomagalke in citotoksični limfociti T	29
2.3.3 Regulatorni limfociti T	30
2.3.4 Receptor in ligand programirane celične smrti 1	31
2.4 KAKOVOST ŽIVLJENJA PACIENTOV V VETERINARSKI MEDICINI	35
3 MATERIAL IN METODE	36

3.1 FARMAKOKINETIKA BLEOMICINA V KRVI PSOV	36
3.1.1 Psi, vključeni v raziskavo	36
3.1.2 Protokol zdravljenja.....	38
3.1.2.1 Elektrokemoterapija.....	40
3.1.2.2 Genski elektroprenos IL-12	41
3.1.3 Jemanje vzorcev krvi.....	42
3.1.4 Priprava in analiza vzorcev	42
3.1.5 Izračun farmakokinetičnih parametrov bleomicina	43
3.1.6 Statistična obdelava podatkov.....	44
3.2 DOLOČANJE SUBPOPULACIJ LIMFOCITOV V KRVI ZDRAVLJENIH PSOV ...	45
3.2.1 Psi, vključeni v raziskavo	45
3.2.2 Protokol zdravljenja.....	46
3.2.3 Jemanje vzorcev krvi.....	46
3.2.4 Izolacija mononuklearnih celic iz periferne krvi.....	47
3.2.5 Pretočna citometrija	47
3.2.6 Statistična obdelava podatkov.....	49
3.3 IZRAŽANJE RECEPTORJEV IN LIGANDOV PROGRAMIRANE CELIČNE SMRTI 1 V TUMORJIH	50
3.3.1 Psi, vključeni v raziskavo	50
3.3.2 Protokol zdravljenja.....	52
3.3.3 Imunohistokemično barvanje.....	52
3.3.4 Statistična obdelava podatkov.....	56
3.4 KAKOVOST ŽIVLJENJA ZDRAVLJENIH PSOV	57
3.4.1 Psi, vključeni v raziskavo	57
3.4.2 Protokol zdravljenja.....	60
3.4.3 Vprašalniki	61

3.4.4 Statistična obdelava podatkov	61
4 REZULTATI	62
4.1 FARMAKOKINETIKA BLEOMICINA V KRVI PSOV.....	62
4.2 SUBPOPULACIJE LIMFOCITOV V KRVI ZDRAVLJENIH PSOV	65
4.3 IZRAŽANJE RECEPTORJEV IN LIGANDOV PROGRAMIRANE CELIČNE SMRTI 1 V TUMORJIH	71
4.4 KAKOVOST ŽIVLJENJA ZDRAVLJENIH PSOV	79
4.4.1 Rezultati Vprašalnika o kakovosti življenja živali.....	79
4.4.2 Rezultati Kratkega testa o vprašalniku	82
5 RAZPRAVA	83
5.1 FARMAKOKINETIKA BLEOMICINA V KRVI PSOV.....	83
5.2 SUBPOPULACIJE LIMFOCITOV V KRVI ZDRAVLJENIH PSOV	87
5.3 IZRAŽANJE RECEPTORJEV IN LIGANDOV PROGRAMIRANE CELIČNE SMRTI 1 V TUMORJIH	90
5.4 KAKOVOST ŽIVLJENJA ZDRAVLJENIH PSOV	94
6 ZAKLJUČKI	98
7 POVZETEK	99
8 SUMMARY	102
9 ZAHVALE	105
10 LITERATURA	107
11 PRILOGE	127
Priloga 1: Pojasnilo lastniku živali.....	127
Priloga 2: Soglasje lastnika živali za sodelovanje v klinični študiji	130
Priloga 3: Vprašalnik o kakovosti življenja zdravljenih živali	132
Priloga 4: Kratki test za lastnike živali	135
Priloga 5: Farmakokinetični parametri BLM v krvi psov	137

Priloga 6: Odstotek T_{reg} v krvi psov tekom zdravljenja	138
Priloga 7: Izražanje PD-1 in PD-L1 v tumorjih psov	140
Priloga 8: Razdelitev psov glede na izražanje PD-1 v tumorjih.....	142
Priloga 9: Razdelitev psov glede na izražanje PD-L1 v tumorjih	144
Priloga 10: Odgovor na zdravljenje pri psih, vključenih v raziskavo HRQoL.....	146
Priloga 11: Rezultati ocene splošnega zdravja psov, vključenih v raziskavo HRQoL.....	148
Priloga 12: Rezultati Kratkega testa o vprašalniku	149
Priloga 13: Članek (Milevoj in sod., 2019)	151
Priloga 14: Članek (Milevoj in sod., 2020)	162

KAZALO SLIK

Slika 1: Učinek EKT na tumorsko celico.....	21
<i>Figure 1: Effect of ECT on the tumour cell.....</i>	21
Slika 2: Eliminacijska krivulja BLM v krvi pri starejših bolnikih, zdravljenih z EKT.....	24
<i>Figure 2: Elimination curve of BLM in the blood of elderly patients treated with ECT.....</i>	24
Slika 3: Protitumorsko delovanje IL-12.....	26
<i>Figure 3: Antitumour effects of IL-12.....</i>	26
Slika 4: Faze imunskega urejanja.....	29
<i>Figure 4: Phases of immunoediting.....</i>	29
Slika 5: Vloga PD-1 in PD-L1 pri aktivaciji, izčrpanju in efektorskem delovanju limfocitov T.....	34
<i>Figure 5: Role of PD-1 and PD-L1 in T-cell activation, exhaustion and effector function.....</i>	34
Slika 6: Generator električnih pulzov.....	40
<i>Figure 6: Generator of electrical pulses.....</i>	40
Slika 7: Vrste elektrod, uporabljenih za EKT.....	41
<i>Figure 7: Types of electrodes, used for ECT.....</i>	41
Slika 8: Ocenjevanje deleža imunohistokemično obarvanih celic v tumorjih.....	54
<i>Figure 8: Assessment of the proportion of immunohistochemically stained cells in the tumours.....</i>	54
Slika 9: Ocenjevanje jakosti imunohistokemičnega obarvanja v tumorjih.....	55
<i>Figure 9: Assessment of the intensity of immunohistochemical staining in the tumours.....</i>	55
Slika 10: Eliminacijska krivulja BLM v krvi pri psih, zdravljenih z EKT.....	62
<i>Figure 10: Elimination curve of BLM in the blood of dogs treated with ECT.....</i>	62
Slika 11: Odstotek CD4+ limfocitov v krvi zdravljenih psov.....	65
<i>Figure 11: Percentage of CD4+ lymphocytes in the blood of treated dogs.....</i>	65
Slika 12: Odstotek CD8+ limfocitov v krvi zdravljenih psov.....	66
<i>Figure 12: Percentage of CD8+ lymphocytes in the blood of treated dogs.....</i>	66
Slika 13: Odstotek T _{reg} v krvi zdravljenih psov.....	67
<i>Figure 13: Percentage of T_{reg} in the blood of treated dogs.....</i>	67
Slika 14: Razmerje CD8+/T _{reg} v krvi zdravljenih psov.....	69
<i>Figure 14: CD8+/T_{reg} ratio in blood of treated dogs.....</i>	69
Slika 15: Odgovor na zdravljenje v skupinah psov s tumorji z nizkim in visokim izražanjem PD-1.....	72
<i>Figure 15: Treatment response in dogs with tumours with high and low PD-1 expression.....</i>	72

Slika 16: Odgovor na zdravljenje v skupinah psov s tumorji z nizkim in visokim izražanjem PD-L1.....	73
<i>Figure 16: Treatment response in dogs with tumours with high and low PD-L1 expression...</i>	73
Slika 17: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja psov s tumorji z nizkim in visokim izražanjem PD-1.....	74
<i>Figure 17: Kaplan-Meier survival curve of dogs with tumours with low and high PD-1 expression.....</i>	74
Slika 18: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja psov s tumorji z nizkim in visokim izražanjem PD-L1.....	75
<i>Figure 18: Kaplan-Meier survival curve of dogs with tumours with low and high PD-L1 expression.....</i>	75
Slika 19: Kaplan-Meierjeva krivulja PFS psov s tumorji z nizkim in visokim izražanjem PD-1.....	76
<i>Figure 19: Kaplan-Meier curve for PFS dogs with tumours with low and high PD-1 expression.....</i>	76
Slika 20: Kaplan-Meierjeva krivulja PFS psov s tumorji z nizkim in visokim izražanjem PD-L1.....	77
<i>Figure 20: Kaplan-Meier curve for PFS dogs with tumours with low and high PD-L1 expression.....</i>	77
Slika 21: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja psov z mastocitomi z nizkim in visokim izražanjem PD-1.....	78
<i>Figure 21: Kaplan-Meier survival curve of dogs with mast cell tumours with low and high PD-1 expression.....</i>	78

KAZALO TABEL

Tabela 1: Psi, vključeni v raziskavo farmakokinetike BLM.....	36
<i>Table 1: Dogs, included in the analysis of BLM pharmacokinetics.....</i>	36
Tabela 2: Razdelitev psov glede na starost, prilagojeno telesni masi.....	38
<i>Table 2: Distribution of dogs, according to the size-related age.....</i>	38
Tabela 3: Psi, vključeni v raziskavo subpopulacij limfocitov v krvi.....	45
<i>Table 3: Dogs, included in the analysis of lymphocyte subpopulations in the blood.....</i>	45
Tabela 4: Podatki o protitelesih, uporabljenih pri pretočni citometriji.....	48
<i>Table 4: Antibody panel, used for flow cytometry.....</i>	48
Tabela 5: Psi, vključeni v raziskavo PD-1/PD-L1.....	50
<i>Table 5: Dogs, included in the PD-1/PD-L1 analysis.....</i>	50
Tabela 6: Psi, vključeni v raziskavo HRQoL.....	57
<i>Table 6: Dogs, included in the HRQoL analysis.....</i>	57
Tabela 7: Vrste zdravljenj pri psih, vključenih v raziskavo HRQoL.....	60
<i>Table 7: Treatment types in dogs, included in the HRQoL analysis.....</i>	60
Tabela 8: Povprečne vrednosti farmakokinetičnih parametrov BLM v krvi psov.....	63
<i>Table 8: Mean values of pharmacokinetic parameters of BLM in the blood of dogs.....</i>	63
Tabela 9: Mediana odstotka T_{reg} v krvi psov z mastocitomi in oralnimi melanomi.....	68
<i>Table 9: Median T_{reg} percentage in the blood of dogs with oral melanomas and mast cell tumours.....</i>	68
Tabela 10: Mediana odstotka T_{reg} v krvi psov, razdeljenih v skupine glede na odgovor na zdravljenje.....	68
<i>Table 10: Median T_{reg} percentage in the blood of dogs, grouped according to treatment response.....</i>	68
Tabela 11: Mediana razmerja CD8+/ T_{reg} v krvi psov z mastocitomi in oralnimi melanomi....	70
<i>Table 11: Median CD8+/T_{reg} ratio in the blood of dogs with oral melanomas and mast cell tumours.....</i>	70
Tabela 12: Mediana razmerja CD8+/ T_{reg} v krvi psov, razdeljenih v skupine glede na odgovor na zdravljenje.....	70
<i>Table 12: Median CD8+/T_{reg} ratio in the blood of dogs, grouped according to the treatment response.....</i>	70
Tabela 13: Ocena HRQoL v štirih preučevanih skupinah psov.....	80
<i>Table 13: HRQoL assessment in the four studied groups of dogs.....</i>	80
Tabela 14: Razlike v oceni HRQoL znotraj preučevanih skupin psov.....	81
<i>Table 14: Differences in HRQoL assessment within the studied groups.....</i>	81

SEZNAM OKRAJŠAV

AUC – območje pod krivuljo; angl. area under curve

BLM – bleomicin

BLMH – bleomicin hidrolaza

CD – označevalec pripadnosti; angl. cluster of differentiation

CL –očistek; angl. clearance

CR – popolni odgovor; angl. complete response

DAMP – s poškodbo povezani molekulski vzorci; angl. damage associated molecular patterns

DNA – deoksiribonukleinska kislina

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

EKT – elektrokemoterapija

GEP – genski elektroprenos

HRQoL – kakovost življenja, povezana z zdravjem; angl. health-related quality of life

IFN- γ – interferon gama

IL-12 – interlevkin-12

k_{el} – konstanta hitrosti izločanja

LC-MS/MS – tekočinska kromatografija, sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo; angl. liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MHC I – poglavitni histokompatibilnostni kompleks I; angl. major histocompatibility complex I

PBMC – mononuklearne celice iz periferne krvi; angl. peripheral blood mononuclear cells

PD – napredovala bolezen; angl. progressive disease

PD-1 – receptor programirane celične smrti 1; angl. programmed cell death-1

PD-L1 – ligand 1 za receptor programirane celične smrti 1; angl. programmed cell death-1 ligand 1

PFS – preživetje brez napredovanja bolezni; angl. progression-free survival

PR – delni odgovor; angl. partial response

RIA – radioimunska analiza

RPMI – tip medija za celične kulture; angl. Roswell Park Memorial Institute

RSD – relativni standardni odklon; angl. relative standard deviation

$t_{1/2}$ – razpolovni čas

TCR – T-celični receptor

TGF- β – transformirajoči rastni dejavnik beta; angl. transforming growth factor β

TNF- α – dejavnik tumorske nekroze alfa; angl. tumour necrosis factor α

T_{reg} – regulatorni limfocit T; angl. regulatory T cell

Vd – porazdelitveni volumen; angl. volume of distribution

WHO – Svetovna zdravstvena organizacija; angl. World Health Organization

1 UVOD

Elektroporacija je fizikalna metoda za vnos molekul (npr. kemoterapevtikov ali plazmidne DNA) v celice. Izpostavitev tkiv kratkim visokonapetostnim električnim pulzom povzroči nastanek prehodnih por v membranah celic in tako omogoči prehod želenih snovi v citosol (1). Elektrokemoterapija (EKT) je lokalna metoda za zdravljenje tumorjev z elektroporacijo v kombinaciji s kemoterapijo. V veterinarski medicini se uporablja za zdravljenje kožnih in podkožnih tumorjev pri psih, mačkah, konjih in nekaterih drugih ljubiteljskih vrstah živali (beli dijurji, ptice, plazilci) (2). Pri zdravljenju intravensko ali intratumorsko apliciramo kemoterapevtik (bleomicin (BLM) ali cisplatin) in nato izpostavimo tumor električnim pulzom (3). Membrana tumorskih celic postane prepustnejša za kemoterapevtike, ki sicer slabo prehajajo v njihovo notranjost (4). Tako dosežemo visoko znotrajcelično koncentracijo zdravila in posledično bolj učinkovito protitumorsko delovanje, obenem pa zmanjšamo sistemsko toksičnost, ker za uspešno zdravljenje potrebujemo nizke odmerke zdravil (5). Poleg EKT se elektroporacija uporablja tudi za genski elektroprenos (GEP), kjer v celice vnašamo plazmidno DNA z zapisom za terapevtski gen. GEP je terapija, pri kateri injiciramo plazmidno DNA v tkivo, ki ga nato izpostavimo električnim pulzom. Ena izmed najbolj raziskanih je imunska terapija z interlevkinom-12 (IL-12), katere varnost in učinkovitost je bila dokazana v predkliničnih študijah na poskusnih živalih in translacijskih študijah na psih (6–8). GEP IL-12 deluje protitumorsko na več načinov: ima antiangiogen učinek, aktivira citotoksične limfocite T in makrofage M1 (9, 10). Poleg lokalnega je bil pri nekaterih spontanih tumorjih dokazan tudi oddaljen učinek na nezdravljeni tumorje, kar pripisujejo povišanemu sistemskemu izločanju interferona gama (IFN- γ) (7, 11, 12).

Kombinacija EKT in GEP IL-12 se rutinsko uporablja za zdravljenje psov z različnimi tumorskimi obolenji (8, 12–15), vendar glede protokolov zdravljenja ostajajo odprta številna vprašanja, predvsem glede specifičnih indikacij za zdravljenje psov, določanja odmerka zdravil, ponavljanja terapije in kakovosti življenja zdravljenih psov.

Pri intravenskem vnosu BLM pri psih, zdravljenih z EKT, začnemo dovajati električne pulze 8 do 10 minut po aplikaciji kemoterapevtika (16). Ta okvir je eksperimentalno določen in izhaja iz rezultatov klinične raziskave pri ljudeh (17). Z novo analitsko metodo, ki temelji na tekočinski kromatografiji, sklopljeni z masno sprekrometrijo (LC-MS/MS), je mogoče

natančno določiti koncentracijo BLM v serumu in tumorjih (18). Na podlagi rezultatov raziskave o farmakokinetiki BLM pri starejših rakavih bolnikih, zdravljenih z EKT, je bil predlagan nižji odmerek BLM in daljši časovni okvir za dovajanje električnih pulzov (19). Rezultati prvih raziskav pri ljudeh kažejo, da ima EKT z nižjim odmerkom BLM primerljiv protitumorski učinek kot zdravljenje s standardnim odmerkom (20, 21). S poznavanjem farmakokinetičnih lastnosti BLM pri psih bo mogoče tudi pri veterinarskih pacientih izboljšati protokol zdravljenja z EKT in ga prilagoditi telesni masi ter starosti živali.

Kljub temu da se je GEP IL-12 izkazal kot uspešno sistemsko adjuvantno zdravljenje tumorskih obolenj pri psih, ne poznamo ustreznih napovednih dejavnikov, ki bi omogočili izbor primernih pacientov in pomagali pri odločitvah o pogostosti ter ponovitvah zdravljenja. Dokazano je bilo, da se pri psih z rakavimi obolenji poviša odstotek ali število krožečih regulatornih limfocitov T (T_{reg}) v krvi (22–25) in da pri nekaterih vrstah tumorjev njihove vrednosti sovpadajo s kliničnim stadijem, stopnjo malignosti ali napredovanjem bolezni (26–28). V *in vitro* razmerah IL-12 zavira proliferacijo T_{reg} (vpliva na nižje izražanje receptorjev za interlevkin 2 (IL-2) in zmanjša izražanje transkripcijskega dejavnika Foxp3 na T_{reg}) (29), zato so bile te celice predlagane kot napovedni dejavniki pri zdravljenju z GEP IL-12 (30). Odstotek krožečih T_{reg} bi lahko uporabljali kot napovedni dejavnik za zgodnje napovedovanje ponovitve bolezni in pri odločjanju, ali je potrebno dodatno zdravljenje.

Receptor programirane celične smrti 1 (PD-1, angl. programmed cell death-1) in njegov ligand 1 (PD-L1, angl. programmed cell death-1 ligand 1) predstavljata t.i. imunske kontrolne točke, ki zavirajo delovanje imunskega odziva. PD-1 negativno uravnava signalno pot T-celičnih receptorjev (TCR) in zavira izločanje citokinov (IFN- γ , IL-2 ter dejavnika tumorske nekroze α (TNF- α , angl. tumor necrosis factor α)) in proliferacijo celic, kar omogoča vzdrževanje periferne tolerance, razvoj tolerance za zunanje antigene ter omejevanje obsega in trajanja normalnega imunskega odziva. Izražanje PD-L1 je povišano v ali na številnih vrstah tumorskih celic in limfocitih, ki infiltrirajo tumor, prav tako pa se na omenjenih limfocitih poviša tudi izražanje PD-1. Vezava PD-L1 na PD-1 omogoča »pobeg« tumorskih celic imunskemu sistemu, saj zavira aktivacijo in proliferacijo citotoksičnih limfocitov T, izločanje citokinov ter povzroči apoptozo tumorsko specifičnih limfocitov T. Tako omogoča lokalno imunosupresijo in prispeva k nastanku za tumor ugodnega mikrookolja (31–33). Pri človeku je izražanje PD-L1 na tumorskih celicah povezano s slabšo prognozo, hitrejšim napredovanjem bolezni in krajšo dobo preživetja bolnikov (33–38). Pri psih je PD-L1 izražen v številnih tumorjih, npr.

oralnem melanomu, osteosarkomu, hemangiosarkomu, mastocitomu idr. (32, 39–41). Tumorji z visokim izražanjem PD-1 in PD-L1 bi lahko slabše odgovarjali na zdravljenje z GEP IL-12, ker imajo izčrpane zaloge citotoksičnih limfocitov T, katerih proliferacijo naj bi stimulirala imunoterapija (33).

V humani medicini je kakovost življenja pomemben dejavnik pri obravnavi rakavih bolnikov, v veterinarski onkologiji pa je ta vidik zdravljenja precej neraziskan. Cilj zdravljenja onkoloških pacientov v veterinarski medicini je zagotavljanje čim boljše kakovosti življenja in pri oceni le-te je najpomembnejši člen lastnik živali. Za izboljšanje načrtovanja zdravljenja in boljšo komunikacijo med lastnikom in veterinarjem je bil sestavljen vprašalnik o kakovosti življenja živali z rakavimi obolenji (42). Povratna informacija in lastnikova ocena uspešnosti zdravljenja nam bosta v prihodnosti pomagali pri načrtovanju zdravljenja psov s tumorji.

1.1 NAMEN

Namen doktorske naloge je bilo vrednotenje postopkov EKT in GEP IL-12 pri zdravljenju spontanih kožnih in oralnih tumorjev pri psih.

1.2 HIPOTEZE

Zastavili smo si štiri delovne **hipoteze**:

- 1** Telesna masa in starost psov vplivata na farmakokinetiko BLM.
- 2** Psom, zdravljenim z GEP IL-12, se po zdravljenju zniža količina T_{reg} v periferni krvi.
- 3** Psi s tumorji, ki izražajo PD-1 in PD-L1, na terapijo z GEP IL-12 odgovarjajo slabše.
- 4** Zdravljenje z GEP IL-12 in/ali EKT zagotavlja dobro kakovost življenja.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 RAKAVA OBOLENJA PRI PSIH

Rakave bolezni so najpogosteji vzrok pogina pri psih (43–45), obolenost pa zaradi številnih vzrokov še naprej narašča. Eden izmed poglavitnih vzrokov je podaljševanje življenjske dobe psov zaradi napredka veterinarske medicine in večje ozaveščenosti lastnikov. Ocenuje se, da vsako leto za rakiom zboli vsaj 4 milijone psov in da jih 45 %, starejših od 10 let, zaradi raka tudi pogine (44, 45). V zadnjih letih so bili po svetu ustanovljeni veterinarski registri raka, ki nam omogočajo oceniti obolenost za rakavimi boleznimi pri domačih živalih; v različnih populacijah so ocenili pojavnost raka med 99,3 in 804 primeri na 100.000 psov (45), kar je primerljivo s pojavnostjo raka pri človeku, ki je ocenjena med 100 in 400 primeri na 100.000 ljudi (46). Najpogosteje vrste tumorjev pri psih so mastocitom, lipom, histocitom, adenom hepatoidnih žlez, adenom žlez lojnic, ploščatocelični karcinom, melanom, fibrosarkom, tumor bazalnih celic, maligni tumor perifernih živčnih ovojnici, papilom, adenokarcinom žlez znojnic in adenokarcinom žlez lojnic (45).

2.1.1 Vloga pasjih modelov v translacijskih raziskavah

Živalski modeli so izjemno pomembni pri raziskovanju zdravljenja in preprečevanja nastanka rakavih obolenj pri človeku (47). V predkliničnih raziskavah so nepogrešljivi mišji modeli, ki se uporabljajo predvsem za raziskovanje molekulskih procesov in patoloških značilnosti tumorjev (48). S takimi modeli so odkrili številne mehanizme nastanka in razvoja raka, kot so maligna transformacija, napredovanje bolezni ter razvoj odpornosti na zdravila (49). Kljub uporabnosti za raziskave raka pa so tumorji na mišjih modelih inducirani, zato ne odsevajo strukturne in genetske kompleksnosti spontanih tumorjev. Domače živali, predvsem psi, so odličen model za translacijo v humano onkologijo, saj se pri njih pojavljajo spontani tumorji, ki so s kliničnega in epidemiološkega vidika pogosto podobni tistim pri ljudeh. Imajo primerljivo klinično sliko, histološko in genetsko strukturo, molekulske tarče, biološko obnašanje ter odgovor na konvencionalna onkološka zdravljenja (44, 50). Spontano nastali tumorji pri psih se razvijajo počasi ob intaktnem imunkem sistemu, v podobnem življenjskem

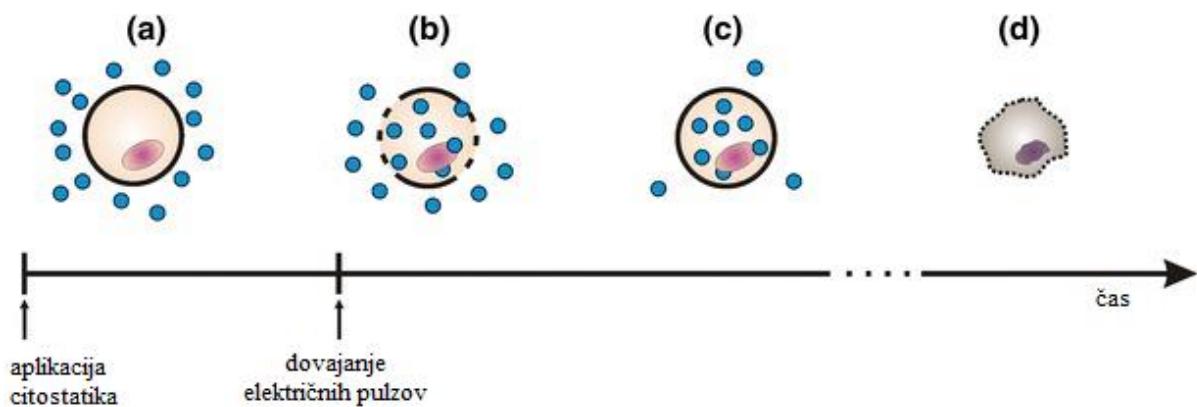
okolju kot pri človeku in ob interakciji med gostiteljem ter tumorskim mikrookoljem, ki omogoča ponovitev bolezni in razvoj zasevkov. Pri psih delujejo določeni encimski sistemi podobno kot pri človeku, poleg tega pa njihova telesna velikost omogoča odvzem ustreznih vzorcev med zdravljenjem (50). Krajša življenjska doba psov v primerjavi z ljudmi in sorazmerno hitrejši naravni potek bolezni dodatno omogočata hitrejše pridobivanje rezultatov o vplivu zdravljenja na potek bolezni ter čas preživetja (51). Poleg tega je v veterinarski onkologiji manj uveljavljenih zlatih standardov zdravljenja kot v humani medicini, zato je etično bolj sprejemljivo preskušati nove, obetavne terapije. Vrste rakavih obolenj, ki so posebej pomembne za translacijsko onkologijo, so: melanom, ne-Hodgkinov limfom, levkemija, osteosarkom, mehkotkivni sarkom in karcinomi prostate, dojke, pljuč, glave in vratu ter sečnega mehurja (50).

2.2 ELEKTROPORACIJA

Elektroporacija ali elektropermeabilizacija je povečanje prehodnosti celične membrane zaradi vpliva električnega polja. Dovajanje kratkih visokonapetostnih električnih pulzov povzroči nastanek por v membranah celic in tako omogoči prehod vodotopnih ionov ter molekul v citosol (1). Poglavitni dejavnik za uspešno permeabilizacijo je inducirana transmembranska napetost, ki nastane ob prisotnosti zunanjega električnega polja zaradi razlike v električnih lastnostih membrane in zunanjega medija (52). Povečanje prepustnosti celične membrane je lahko prehodno (reverzibilna elektroporacija) ali pa neposredno povzroči smrt celic (ireverzibilna elektroporacija), odvisno od časa izpostavitve celic električnim pulzom in jakosti električnega polja. Vzrok smrti celic pri ireverzibilni elektroporaciji je trajna liza celične membrane in posledično porušenje celične homeostaze (53). Pri ireverzibilni elektroporaciji uporabljamo samo električne pulze, pri reverzibilni pa elektroporacijo uporabimo kot dostavno metodo za vnašanje želenih molekul (npr. kemoterapevtikov ali plazmidne DNA) v celice (54, 55).

2.2.1 Elektrokemoterapija

EKT je lokalna metoda zdravljenja tumorjev z reverzibilno elektroporacijo v kombinaciji s kemoterapijo. Pri zdravljenju intravensko ali intratumorsko apliciramo hidrofilni kemoterapevtik (BLM ali cisplatin) in nato dovajamo električne pulze neposredno na ali v tumor. Membrane tumorskih celic postanejo prepustnejše za kemoterapevtike, ki sicer slabo prehajajo v notranjost celic (3, 16). Tako dosežemo visoko znotrajcelično koncentracijo zdravila in posledično do 70-krat (cisplatin) ali večtisočkrat močnejše (BLM) protitumorsko delovanje (4, 56–58) (Slika 1). Zaradi povečane citotoksičnosti BLM in cisplatina na mestu dovajanja električnih pulzov so potrebni nizki odmerki kemoterapevtikov, zato dosežemo dober lokalni učinek z minimalno sistemsko toksičnostjo. Terapija ima tudi antivaskularni učinek; po dovajanju električnih pulzov nastane vazokonstrikcija (angl. »vascular lock«), ki povzroči retencijo kemoterapevtikov v tumorju (59, 60). Poleg tega zmanjšan dotok krvi povzroči hipoksijo tumorskih celic in njihovo nekrozo. Kemoterapevtiki delujejo citotoksično tudi na endoteljske celice majhnih žil v tumorju, kar še dodatno zmanjša dotok krvi v tumor (61).



Slika 1: Učinek EKT na tumorsko celico: a) kemoterapevtik po aplikaciji obda tumorsko celico, b) nastanek por v celični membrani omogoči prehod kemoterapevtika v celico, c) pore se zaprejo, selektivnost celične membrane se povrne v prvotno stanje in kemoterapevtik ostane ujet znotraj celice, d) kemoterapevtik uniči tumorsko celico. Povzeto po (62)

Figure 1: Effect of ECT on the tumour cell: a) after the injection, the chemotherapeutic agent surrounds the tumor cell, b) formation of pores after pulse delivery and chemotherapeutic entering the cell, c) the membrane pores reseal, the cell selectivity of the membrane membrane is restored and the chemotherapeutic is entrapped inside the cell, d) the chemotherapeutic kills the tumour cell. Adapted from (62)

EKT sproži apoptozo in nekrozo tumorskih celic in nekaj dni po terapiji nastane na mestu zdravljenja obsežno področje nekroze. Propadajoče tumorske celice v zunajcelični prostor sproščajo tumorske antigene in s poškodbo povezane molekulske vzorce (DAMP, angl. damage associated molecular patterns), ki sprožijo citotoksičen imunski odziv proti preživelim malignim celicam. Pojav imenujemo imunogena celična smrt in za njeno delovanje je potrebna kombinacija treh DAMP: izpostavitev kalretikulina na celični membrani in sproščanje adenozin trifosfata (ATP) ter proteina HMGB1 (angl. high mobility group box 1) iz propadajočih tumorskih celic (63).

EKT je uveljavljena v več kot 140 humanih kliničnih centrih po Evropi in je del več nacionalnih smernic za zdravljenje kožnih tumorjev pri ljudeh, kot so npr. smernice National Institute for Health and Care Excellence (NICE) (64, 65). V zadnjem času se uporaba EKT v onkologiji uspešno širi tudi na področje zdravljenja globoko ležečih tumorjev, npr. primarnih in metastatskih tumorjev jeter, kolorektalnih tumorjev, tumorjev trbušne slinavke, prostate, požiralnika ter zasevkov v kosteh (66–73).

V veterinarski medicini se uporablja za zdravljenje kožnih, podkožnih in oralnih tumorjev pri psih (74–78) ter kožnih tumorjev pri mačkah (79), konjih (80, 81) in drugih vrstah ljubiteljskih živali, npr. belih dihurjih, podganah, afriških beloprsih ježih, želvah ter ljubiteljskih vrstah ptic (82–87). Pri določenih vrstah tumorjev pri psih dosežemo do 70 % (74) in pri mačkah do 80 % (79) popolnih odgovorov z minimalnimi lokalnimi in brez sistemskih stranskih učinkov. Protitumorska učinkovitost je obratno sorazmerna z volumnom tumorja; tumorji, ki so manjši od 2 cm³, na terapijo odgovarjajo bolje kot večji tumorji (16). V raziskavi, kjer so primerjali EKT s kirurškim zdravljenjem mastocitomov pri psih, so ugotovili, da so z EKT dosegli 70 % popolnih odgovorov, medtem ko je bil pri kirurškem zdravljenju uspeh 50-% (74). Tako je bilo dokazano, da je EKT pri manjših tumorjih enakovredna kirurškemu zdravljenju, ki velja za metodo izbire pri zdravljenju mastocitomov. Pri večjih tumorjih lahko s kombinacijo kirurške odstranitve in intraoperativne EKT izboljšamo izid zdravljenja (88). EKT je posebej primerna za zdravljenje solidnih tumorjev, kadar se lastniki živali ne odločijo za kirurški poseg oziroma se tumorji nahajajo na mestih, kjer bi bila popolna odstranitev nemogoča (npr. v bližini velikih krvnih žil, tumorji glave in okončin, perianalni tumorji) (16). Tudi v veterinarski medicini so bili nedavno opisani prvi primeri uporabe EKT pri globoko ležečih tumorjih, in sicer za zdravljenje nosnih tumorjev, kolorektalnega karcinoma in karcinoma ščitnice pri psu ter timoma pri mački (59, 89–91).

2.2.1.1 Cisplatin

Cisplatin je derivat platine, ki deluje citotoksično prek različnih mehanizmov, predvsem pa z interakcijo s purinskimi bazami in posledično poškodbo DNA, ki ji sledi aktivacija različnih signalnih poti, ki povzročijo apoptozo celice (92). V veterinarski onkologiji ima pri psih protitumorski učinek pri zdravljenju osteosarkoma, karcinoma prehodnega epitelija, ploščatoceličnega karcinoma, melanoma, mezotelioma, karcinomatoze in tumorjev zarodnih celic (93). Pri intravenski uporabi je nefrotoksičen za pse, pri mačkah pa je kontraindiciran zaradi nastanka fulminantnega pljučnega edema (93). Intratumorska aplikacija cisplatina pri psih in mačkah je pri EKT varna in učinkovita (94).

2.2.1.2 Bleomicin

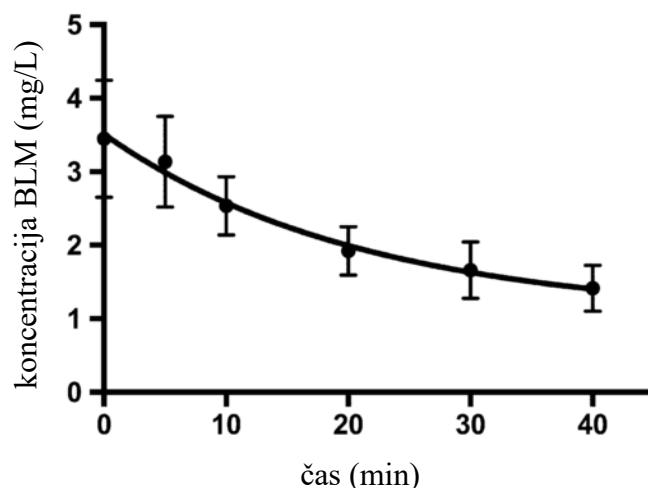
BLM je citotoksični polipeptidni antibiotik, ki ga proizvaja *Streptomyces verticillus* (95). Je mešanica več kot desetih komponent, izmed katerih prevladujeta BLM A2 in BLM B2 (96). Zaradi svojih hidrofilnih lastnosti ima BLM izredno omejeno sposobnost prehajanja v citoplazmo celic; ker s pasivno difuzijo ne more prehajati skozi celično membrano, v notranjost celice vstopa le z endocitozo (97, 98). Znotraj celice se veže z ioni železa ali bakra in s kisikom, kar povzroči nastanek prostih radikalov ter posledično eno- in dvooverižne prelome DNA (99). BLM razgrajuje bleomicin hidrolaza (BLMH), encim, ki se nahaja v različnih tkivih. Toksična učinka BLM, ki omejujeta njegov odmerek pri človeku, sta pljučna fibroza in toksičen učinek na kožo (deskvamacija, hiperpigmentacija, pruritični eritem) in sta posledici relativno majhne količine BLMH v pljučnem tkivu ter koži (100). Aktivnost BLMH v tumorskem tkivu je eden glavnih mehanizmov odpornosti nekaterih tumorskih celic na BLM (96). Pri človeku se 60–70 % BLM izloča v aktivni obliki skozi ledvice (101).

BLM se v veterinarski medicini pri sistemski kemoterapiji uporablja redko; občasno je bila uporaba opisana pri dopolnilnem zdravljenju limfomov, oralnih ploščatoceličnih karcinomov, teratomov in nefunkcionalnih tumorjev ščitnice pri psih in mačkah (101). Danes je uporaba BLM v veterinarski onkologiji zelo omejena, v zadnjem desetletju je bilo opisano le uspešno zdravljenje akantomatoznega ameloblastoma z intratumorsko aplikacijo BLM (102).

Področje, kjer je BLM nepogrešljiv, pa je EKT. Kadar pri psih, zdravljenih z EKT, uporabljamo intravensko aplikacijo BLM, je odmerek 0,3 mg/kg telesne mase, apliciran v počasnem bolusu; električne pulze dovajamo 8 do 10 minut po aplikaciji BLM (16). Ta odmerek in časovni okvir sta prenesena iz humane onkologije, kjer je časovni okvir za dovajanje pulzov od 8 do 28 minut po aplikaciji BLM, kar temelji na protitumorskem učinku, ugotovljenem pri sedmih pacientih (17).

Nedavno so razvili analitsko metodo, ki temelji na LC-MS/MS, s katero lahko natančno določimo koncentracijo BLM v serumu in tumorskem tkivu (18). V predkliničnih raziskavah na miših so ugotovili, da ožiljenost tumorjev vpliva na koncentracijo BLM v tumorskem tkivu, zdravljenim z EKT. Koncentracija BLM v tumorjih pri miših ni korelirala s koncentracijo BLM v serumu, temveč je bila odvisna od vrste tumorja in gostote tumorskega žilja (103).

S to metodo so določili farmakokinetične lastnosti pri starejših bolnikih (> 65 let), zdravljenih z EKT (19) (Slika 2). Na podlagi rezultatov je bil predlagan nižji odmerek BLM (10.000 IU/m^2) in daljši časovni okvir za dovajanje električnih pulzov (8 do 40 minut po aplikaciji BLM) (104). Rezultati prvih kliničnih raziskav kažejo, da ima EKT z nižjim odmerkom BLM primerljiv protitumorski učinek kot s standardnim odmerkom (15.000 IU/m^2) (20, 21).



Slika 2: Eliminacijska krivulja BLM v krvi pri starejših bolnikih, zdravljenih z EKT. Pri starejših bolnikih (> 65 let) ima po intravenski aplikaciji BLM monofazno serumsko eliminacijsko krivuljo. Točkovne oznake prikazujejo povprečne vrednosti s pripadajočimi standardnimi odkloni. BLM-bleomicin, EKT-elektrokemoterapija. Povzeto po (19)

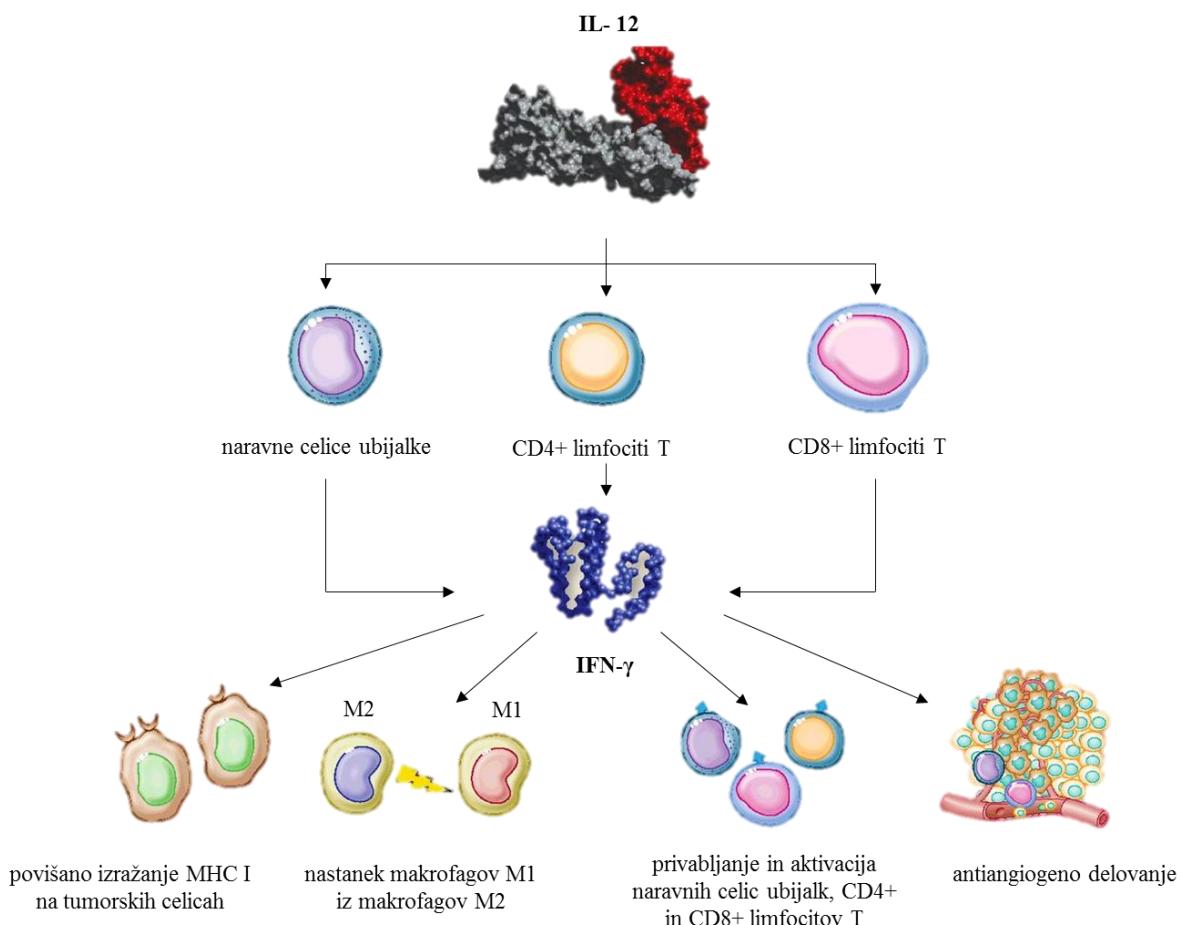
Figure 2: Elimination curve of BLM in the blood of elderly patients treated with ECT. In elderly patients (> 65 years), BLM has a monophasic serum elimination curve. The points represent mean values with corresponding standard errors of the mean. BLM-bleomycin, ECT-electrochemotherapy. Adapted from (19)

V veterinarski medicini je bila edina raziskava o farmakokinetiki BLM izvedena leta 1979 na petih zdravih poskusnih psih (105), od takrat pa po naših podatkih ni bilo nobenih raziskav, pri katerih bi uporabljali sodobnejše analitske metode ali večje poskusne skupine.

2.2.2 Genski elektroprenos IL-12

GEP je sistemski imunoterapiji, pri kateri z reverzibilno elektroporacijo v celice vnašamo plazmidno DNA z zapisom za terapevtski gen in tako povečamo proizvodnjo želenega proteina ter njegovo sproščanje v krvni obtok. Tkivi, ki sta najpogosteje uporabljeni za GEP, sta skeletno mišično tkivo in koža. Prednost kože kot tarčnega organa za GEP je ta, da je dostopno veliko področje za zdravljenje, celice v različnih plasteh kože (dokazano keratinociti) pa so sposobne proizvajanja in sproščanja želenih beljakovin v krvni obtok (106, 107). Prav tako je v koži veliko antigen predstavitvenih celic (APC), ki imajo pomembno vlogo pri imunoterapijah in imunskega odzivu proti rakavim celicam (106). GEP se lahko kombinira z EKT, saj ubijata tumorske celice na različne načine; intratumorska EKT neposredno uničuje tumorske celice, medtem ko GEP v okolna tkiva transfecira zdrave celice in tako sistemsko okrepi protitumorski imunski odziv (106).

Ena izmed najbolj raziskanih vrst GEP doslej je imunska terapija z IL-12, katere varnost in učinkovitost je bila dokazana v predkliničnih študijah na poskusnih živalih in translacijskih študijah na psih (6–8). IL-12 deluje protitumorsko na več načinov: spodbuja aktivacijo limfocitov T, podaljša njihovo preživetje, izboljša efektorsko delovanje limfocitov T in naravnih celic ubijalk ter spodbuja izločanje IFN- γ . Ta deluje neposredno na tumorske celice, saj poveča prepoznavanje poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa I (MHC I, angl. major histocompatibility complex I) na tumorskih celicah in omogoči spremenjanje zunajceličnega matriksa, kar povzroči zmanjšanje angiogeneze ter tumorske invazije; sproži tudi infiltracijo tumorja z makrofagi M1, ki delujejo protitumorsko (9, 10, 108) (Slika 3). Končni rezultat vseh navedenih procesov je upočasnjena rast tumorja in, končno, njegovo uničenje. Vzpostavi se dolgotrajna protitumorska imunost; v predkliničnih raziskavah na miših s ploščatoceličnim karcinomom so bile ozdravljene živali še 11 mescev odporne na ponovni izrast tumorja, tudi če so jim vsak mesec v podkožje aplicirali enake tumorske celice (9). Podobne rezultate so pokazale tudi študije na tumorskem modelu fibrosarkoma (109). Poleg tega je bil pri melanomu pri človeku in ploščatoceličnem karcinomu pri psu dokazan tudi sistemski oddaljen učinek na nezdravljene tumorje in metastaze (11, 12).



Slika 3: Protitumorsko delovanje IL-12: IL-12 povzroči sproščanje IFN- γ iz naravnih celic ubijalk, CD4+ in CD8+ limfocitov. IFN- γ ima najpomembnejšo vlogo pri imunostimulacijskem delovanju IL-12; deluje na tumorske celice, makrofage, limfocite in endotelijske celice. IFN- γ -interferon gama, MHC I- poglavitni histokompatibilnostni kompleks I. Povzeto po (110)

Figure 3: Antitumour effects of IL-12: IL-12 induces the release of IFN- γ from natural killer cells and CD4+ and CD8+ T lymphocytes. IFN- γ is the main mediator of the immunostimulatory properties of IL-12 and has an important effect on macrophages, lymphocytes, tumour cells and endothelial cells. IFN-interferon gamma, MHC I-major histocompatibility complex I. Adapted from (110)

Po GEP IL-12 so Pavlinova in sod. (111) preučevali histološke spremembe v mastocitomih zdravljenih psov. Po intratumorski aplikaciji plazmida so ugotovili zmanjšano število in degranulacijo tumorskih celic ter obsežne infiltracije tumorskega tkiva z limfociti in plazmatkami. Njihova opažanja so potrdila ugotovitve predhodnih raziskav na miših z melanomom (112, 113), kjer je bila po zdravljenju ugotovljena infiltracija tumorja s celicami T pomagalkami (CD4+ limfociti) in citotoksičnimi limfociti T (CD8+ limfociti). Podobno so

opazili pri konjih z melanomom, zdravljenimi zgolj z intratumorsko aplikacijo plazmida z zapisom za humani IL-12 brez GEP (114); v teh primerih je bila infiltracija predvsem peritumorska, prevladovali pa so CD4+ limfociti. Pri ljudeh z metastatskim melanomom, zdravljenih z GEP IL-12, pa so ugotovili tudi intratumorsko infiltracijo s CD4+ in CD8+ limfociti (11).

Samostojna terapija z GEP IL-12 ima dokazano lokalno in sistemsko protitumorsko delovanje (9, 111, 115), uspešnost zdravljenja pa lahko povečamo s kombiniranimi pristopi, npr. z dodatnim obsevanjem (116) ali EKT (30). Serša in sod. (30) so razvili model, pri katerem uporabimo EKT kot *in situ* vakcinacijo, s peritumorsko GEP IL-12 pa pospešimo sprožen imunski odziv proti tumorskim antigenom, ki se sproščajo iz propadajočih tumorskih celic.

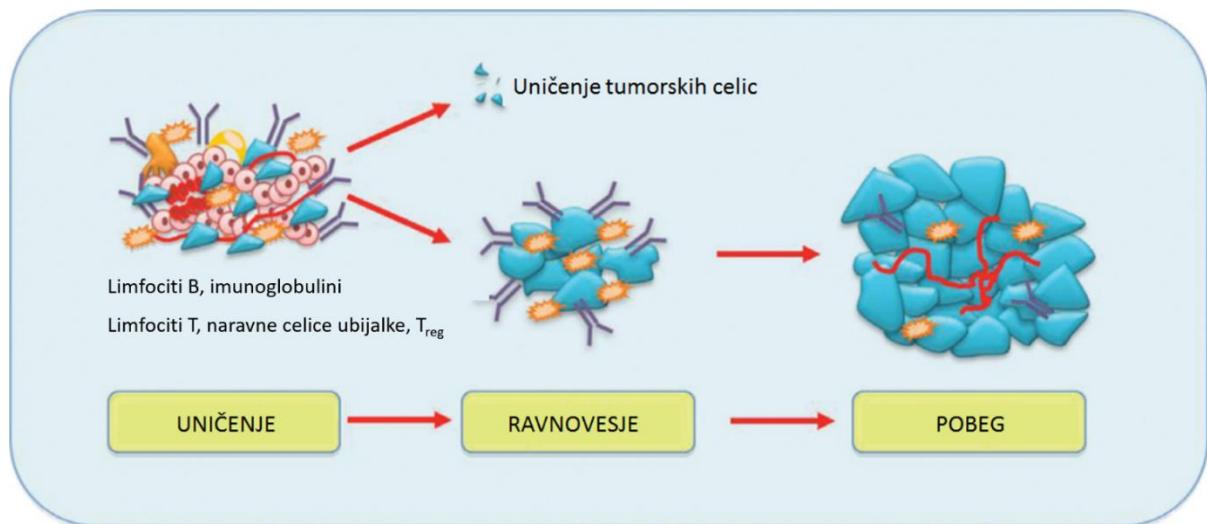
Kombinacija zdravljenja z EKT in GEP IL-12 se že uporablja pri zdravljenju nekaterih tumorjev pri psih (8, 13, 15, 117). Pri zdravljenju mastocitomov pri psih se je izkazalo, da dodatno zdravljenje z GEP s peritumorsko aplikacijo plazmida z zapisom za humani IL-12 izboljša odstotek popolnih odgovorov na 72 % v primerjavi z 62 %, če zdravimo samo z EKT (8). Lamprechtova in sod. (118) so pozneje razvili plazmid z zapisom za pasji IL-12, ki smo ga uporabili pri zdravljenju psov z oralnim melanomom, kjer se je kombinacija EKT in GEP IL-12 izkazala za podobno uspešno kot obsevanje (13).

2.3 RAK IN IMUNSKI ODZIV

2.3.1 Vloga imunskega sistema pri tumorskih obolenjih

Imunski sistem ima pomembno vlogo tako pri obrambi pred tumorji kot v procesu njihovega napredovanja in zasevanja. V zadnjih letih je imunoterapija postala eden izmed najbolj obetavnih načinov zdravljenja raka. Z odkritjem imunskeih kontrolnih točk in molekularnih tarč postaja zdravljenje vedno bolj specifično in prilagojeno vsakemu bolniku posebej. Kljub izjemnemu napredku pa so popolne ozdravitve redke in je večina zdravljenj primerna le za manjšino bolnikov, odgovori pa so pogosto kratkotrajni. Neuspešnost imunoterapije in napredovanje tumorjev je posledica pobega tumorskih celic imunskemu sistemu (119).

Razmerje med tumorjem in imunskim sistemom je razloženo s hipotezo imunskega urejanja (angl. immunoediting), ki pojasnjuje tesno povezavo med tumorjem in imunskim sistemom ter dvojno vlogo imunskega sistema pri rakavih obolenjih (120). Imunsko urejanje poteka v treh fazah: uničenje, ravnovesje in pobeg (Slika 4). V fazi **uničenja** imunski sistem prepozna in uniči tiste tumorske celice, ki izražajo tumorske antigene. Tumorske celice, ki so manj imunogene, se lahko fazi uničenja izognejo in vstopijo v fazo **ravnovesja**. V tej fazi se lahko naprej delijo in, naključno ali kot posledica imunsko povzročenega vnetja, pridobivajo nove mutacijske spremembe. V tem času se vzdržuje ravnovesje med imunskim nadzorom in rastjo tumorja, zato bolezen navidezno miruje. Vendar ti procesi sčasoma omogočijo tumorjem, da oslabijo sposobnost imunskega sistema, da ta uniči tumorske celice. To lahko dosežejo bodisi z zmanjšanjem izražanja tarčnih antigenov bodisi z imunosupresivnim delovanjem. Na tej stopnji se začne faza **pobega** tumorja, ki se pokaže kot klinično zaznavna bolezen (120). Tumorske celice uporabljajo različne načine za izogibanje imunskemu odzivu: sprožanje povečane proliferacije T_{reg} , zmanjšano izražanje tumorskih antigenov, izločanje imunosupresivnih dejavnikov (npr. transformirajoči rastni dejavnik beta (TGF- β , angl. transforming growth factor β), TNF- α , IL-1, IL-6, CSF-1, IL-8, IL-10 in interferonov tipa I), izražanje PD-1 in PD-L1, povzročanje apoptoze specifičnih CD8+ limfocitov (120).



Slika 4: Faze imunskega urejanja: V fazi uničenja limfociti T in B uničijo tumorske celice, ki izražajo tumorske antigene. Nekatere tumorske celice se fazi uničenja izognejo in vstopijo v fazo ravnovesja. Sčasoma lahko pobegnejo imunskemu nadzoru in se naprej delijo, kar povzroči povečanje tumorske mase. T_{reg} -regulatorni limfociti T. Povzeto po (121)

Figure 4: Phases of immunoediting: In the elimination phase, T and B lymphocytes cause the elimination of tumour cells. Some of them avoid elimination and enter the equilibrium phase. Eventually, the cells can escape from immunosurveillance and grow, allowing tumour mass expansion. T_{reg} -regulatory T cells. Adapted from (121)

2.3.2 Celice T pomagalke in citotoksični limfociti T

Limfociti T imajo pomembno vlogo pri celični imunosti. Nastajajo v kostnem mozgu in nato kot nezrele prekurzorske celice potujejo v timus, kjer se pred vstopom v krvni in limfni obtok v skorji timusa diferencirajo v CD4+ ali CD8+ limfocite. CD4+ limfociti (limfociti Th₁ in Th₂) na membrani izražajo CD4 (angl. cluster of differentiation 4) in z izločanjem citokinov uravnavajo delovanje imunskega odziva. Limfociti Th₁ po stimulaciji izločajo IFN- γ , TGF- β , TNF- α in IL-2. Ti citokini aktivirajo in spodbujajo nastanek CD8+ limfocitov. CD8+ limfociti na svoji membrani izražajo CD8 in ubijajo tumorske celice ter celice, okužene z virusi (122).

Imunosupresivni učinki tumorjev pogosto povzročijo neravnoesje v subpopulacijah limfocitov T v tumorskem mikrookolju in krvi. Dokazano je bilo, da imajo psi z različnimi vrstami tumorjev (limfom, karcinom, mastocitom, različne vrste sarkomov, melanom) nižji odstotek ali število CD8+ limfocitov v krvi kot zdravi psi (23, 25, 123, 124), psi s karcinomom in limfomom pa tudi nižji odstotek ali število CD4+ limfocitov v krvi (123, 124). Tekom kemoterapije se je

pri psih z limfomom absolutno število in odstotek CD4+ in CD8+ limfocitov povišalo na normalno vrednost (124). Pri psih z osteosarkomom niso opazili korelacije med odgovorom na zdravljenje in odstotkom ali absolutnim številom teh celic v krvi (23).

Vpliv GEP IL-12 na subpopulacije limfocitov v periferni krvi je bil doslej ovrednoten le v predkliničnih raziskavah na miših, kjer so zaznali povišanje odstotka spominskih CD4+ in CD8+ limfocitov (125).

2.3.3 Regulatorni limfociti T

T_{reg} spadajo v subpopulacijo limfocitov T, ki povzroča zavoro imunskega odziva z delovanjem na aktivnost drugih vrst celic imunskega sistema, predvsem limfocitov T (122). Povečana proliferacija in diferenciacija T_{reg} pri tumorskih obolenjih je posledica sproščanja vaskularnega endotelijskega rastnega dejavnika (VEGF, angl. vascular endothelial growth factor), IL-10 in TGF- β iz tumorskih celic. Ti citokini zavirajo diferenciacijo in funkcijo dendritičnih celic, kar posledično spodbuja proliferacijo T_{reg} (126).

Zavora imunskega sistema, ki jo v tumorskem mikrookolju povzročajo T_{reg} in druge celice zaviralke, je pomemben mehanizem pri pobegu tumorjev imunskemu sistemu in ključna ovira pri zdravljenju z imunoterapijo (30, 120). Povečano izločanje nekaterih citokinov (IL-10, TGF- β) in kemokinov iz tumorskih celic sproži proliferacijo T_{reg} , ki imajo večjo sposobnost zaviranja imunskega odziva kot naravno prisotne T_{reg} (127, 128). V tumorju in njegovi okolici delujejo tako, da zmanjšujejo aktivnost CD4+ in CD8+ limfocitov T ter naravnih celic ubijalk (129). V predkliničnih raziskavah so dokazali, da ima sistemski inaktivacija T_{reg} s protitelesi proti CD25 neposreden vpliv na učinkovitost imunoterapije GEP plazmida z zapisom za granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (GM-CSF, angl. granulocyte macrophage-colony stimulating factor) in kostimulatorne molekule B7-1 (130). Kombinirano zdravljenje je uspešno zmanjšalo tudi oddaljene zasevke melanoma pri miših (131).

Delež T_{reg} se ne poviša samo v tumorskem mikrookolju in okолнem tkivu. Dokazali so, da se tako pri ljudeh (126) kot pri psih (22–25) z rakavimi obolenji poviša odstotek T_{reg} v krvi in da pri nekaterih vrstah tumorjev odstotek ali število T_{reg} sovpada s kliničnim stadijem, stopnjo malignosti ali napredovanjem bolezni (26–28). Pri psih z osteosarkomom niso ugotovili povezave med odstotkom T_{reg} v krvi in prognozo, vendar so imeli oboleli psi znižano razmerje

med odstotkoma CD8+ limfocitov in T_{reg} (CD8+/T_{reg}) v krvi; v omenjeni raziskavi je bilo znižano razmerje CD8+/T_{reg} v krvi povezano s slabšo prognozo (23). O'Neill in sod. (25) so razmerje CD8+/T_{reg} v krvi primerjali pri psih z različnimi vrstami tumorjev (sarkomi, karcinomi, limfomi, mastocitomi, melanomi) in pri zdravih psih. Ugotovili so, da so imeli psi s tumorji nižje razmerje CD8+/T_{reg} v krvi kot zdravi psi; ko pa so pse razdelili v skupine glede na vrsto tumorjev, so opazili značilno razliko le pri psih s karcinomi. Ugotovitve so v skladu z rezultati iz humane onkologije, kjer razmerje CD8+/T_{reg} povezujejo s slabšo prognozo predvsem pri epitelnih tumorjih (132–135).

Povezava med vplivom različnih vrst imunoterapije na delež T_{reg} v tumorju in periferni krvi še ni popolnoma razjasnjena. Imunoterapija z IL-2 se uporablja pri zdravljenju pacientov z virusom imunske pomanjkljivosti (HIV, angl. human immunodeficiency virus) in pri nekaterih vrstah rakavih obolenj. Ugotovili so, da se je po zdravljenju različnih vrst tumorjev povišal delež T_{reg} v krvi in tumorskem mikrookolju (126), kar je povzročilo dvome glede učinkovitosti zdravljenja. V *in vitro* razmerah je IL-12 zmanjšal proliferacijo T_{reg} (29). V predkliničnih in kliničnih raziskavah so ocenjevali prisotnost T_{reg} v tumorskem tkivu po zdravljenju z GEP IL-12. Število T_{reg} se je začasno sicer zmanjšalo, a je nato do 4-kratno naraslo od 3 do 10 dni po zdravljenju (14, 136). Vpliv GEP IL-12 na dinamiko T_{reg} v periferni krvi še ni raziskan.

2.3.4 Receptor in ligand programirane celične smrti 1

PD-1 je transmembranski protein, ki spada v družino imunoglobulinov CD28. Je eden najpomembnejših zaviralnih koreceptorjev, ki jih na membrani izražajo limfociti T. Izraža se tudi na limfocitih B, monocitih, naravnih celicah ubijalkah in dendritičnih celicah. Aktivacija limfocitov T in B, monocitov in dendritičnih celic sproži izražanje PD-1 na plazmalemi in s tem omeji trajanje in obseg pridobljenega imunskega odziva (137).

PD-L1 je koinhibitorna molekula, ki spada v skupino transmembranskih proteinov B7. mRNA za PD-L1 je izražena v različnih vrstah celic: limfocitih T in B, monocitih, plazmacitoidnih in mieloidnih dendritičnih celicah ter drugih vrstah nehematopoetskih celic, npr. epitelijskih in endotelijskih celicah ter celicah Langerhansovih otočkov trebušne slinavke. Konstitutivno izražanje PD-L1 so v nizkih koncentracijah dokazali na limfocitih, antigen predstavitvenih celicah, celicah roženice in Langerhansovih otočkov ter sinciciotroblastih (137, 138).

PD-1 in PD-L1 predstavljata t.i. imunske kontrolne točke (angl. immune checkpoint molecules), ki zavirajo imunski odziv. PD-1 negativno uravnava signalno pot TCR in zavira izločanje citokinov IFN- γ , IL-2 in TNF- α ter proliferacijo celic, kar v normalnih razmerah omogoča uravnavanje imunskega odziva in ščiti organizem pred pretiranimi imunskimi reakcijami (139) (Slika 5). Moteno delovanje imunskeih kontrolnih točk lahko povzroči hiperimunsko reakcijo ali trajni vnetni odziv, kar vodi v avtoimune ali kronične vnetne bolezni. Vezavo PD-L1 na PD-1 pa izkoriščajo tudi rakave celice za pobeg imunkemu sistemu (139).

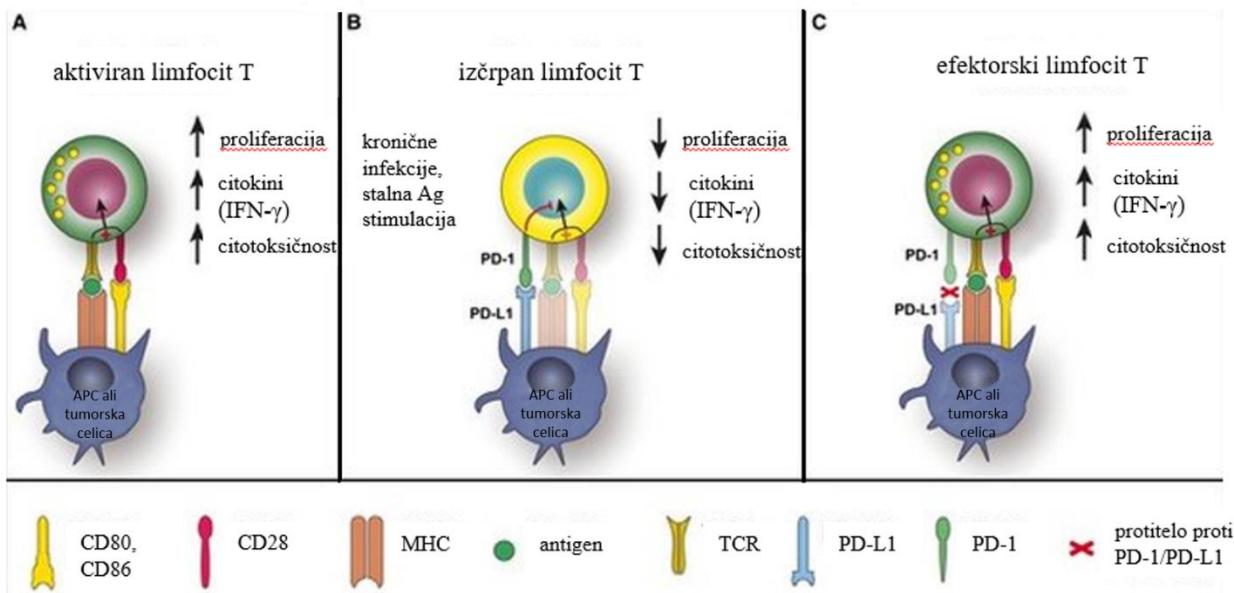
Izražanje PD-L1 je povišano pri številnih tumorskih celicah in limfocitih, ki infiltrirajo tumor, prav tako pa se na omenjenih limfocitih poviša tudi izražanje PD-1. Vezava PD-L1 na PD-1 omogoča pobeg tumorskih celic imunkemu sistemu, saj zavira aktivacijo in proliferacijo CD8+ limfocitov T, izločanje citokinov ter povzroči apoptozo tumorsko specifičnih limfocitov T. Izčrpanje zaloga CD8+ limfocitov povzroči lokalno imunosupresijo in prispeva k razvoju tumorskega mikrookolja (31–33).

Pri človeku je bilo izražanje PD-L1 v tumorskem mikrookolju v številnih raziskavah povezano s slabšo prognozo, hitrejšim napredovanjem bolezni in krajšo dobo preživetja bolnikov z različnimi vrstami tumorjev (33–38). V posameznih raziskavah pa je bilo visoko izražanje PD-1 (140) ali PD-L1 (140–142) povezano z ugodnejšo prognozo. Imunoterapija s protitelesi proti PD-1 (nivolumab) ali PD-L1 (pembrolizumab) je pokazala spodbudne rezultate pri zdravljenju bolnikov z melanomom, metastatskim karcinomom ledvic in mehurja ter nedrobnoceličnim rakom pljuč (143–147). Ameriška vladna ustanova za nadzorovanje hrane in živil (FDA, angl. Food and Drug Administration) je odobrila nivolumab za zdravljenje neresektabilnega ali metastatskega melanoma, nedrobnoceličnega raka pljuč, Hodgkinsovega limfoma in karcinoma pljuč, pembrolizumab pa je odobren za zdravljenje melanoma in nedrobnoceličnega raka pljuč (148). Kombinacija nivolumaba ali pembrolizumaba z EKT je bila preskušena pri zdravljenju neresektabilnega ali metastatskega melanoma z obetavnimi rezultati (149).

Pri psih je izražanje PD-1 in PD-L1 povišano v številnih tumorjih, npr. oralnem melanomu, osteosarkomu, hemangiosarkomu, mastocitomu, limfomu idr. (32, 40, 41, 150). V predkliničnih raziskavah so ugotovili, da je visoko izražanje PD-1 in PD-L1 na pasjih tumorskih celicah povezano z odpornostjo na kemoterapijo (150).

V veterinarski medicini se protitelesa proti PD-1 in PD-L1 za zdravljenje tumorjev rutinsko še ne uporabljam. Coy in sod. (151) so razvili pasje protitelo proti PD-1, ki je v predklinični

raziskavi uspešno blokiralo PD-1 in spodbudilo aktivacijo limfocitov T. Maekawa in sod. (152) pa so razvili prvo protitelo proti pasjemu PD-L1 in ga uporabili pri zdravljenju manjše skupine psov z metastatskim oralnim melanomom in nediferenciranim sarkomom. Zdravljenje se je izkazalo za varno, učinkovitost pa primerljiva s tisto pri ljudeh.



Slika 5: Vloga PD-1 in PD-L1 pri aktivaciji, izčrpanju in efektorskem delovanju limfocitov T: A-limfociti T se aktivirajo prek vezave MHC in peptidnega antiga na TCR in povezave CD80/86 na APC s CD28 na limfocitu T. Pri aktivaciji limfocita T se začne izražati PD-1. B-pri kroničnih okužbah ali stalni antigenski stimulaciji se PD-L1 veže na PD-1, kar zavre delovanje limfocitov T in zmanjša nevarnost poškodbe zdravih tkiv. Tumorske celice izražajo PD-L1, da zavrejo delovanje limfocitov T, ki bi jih sicer lahko uničili. C-blokiranje PD-1/PD-L1 signalnih poti omogoča limfocitom T, da ohranijo svoje efektorsko delovanje. Pri bolnikih z rakom lahko aktivirani limfociti T uničijo tumorske celice in izločajo citokine, ki aktivirajo ali privabijo druge celice imunskega sistema, ki sodelujejo pri protitumorskem odzivu. APC-antigen predstavljena celica, IFN- γ -interferon gama, MHC-poglavitni histokompatibilnostni kompleks I, PD-1-receptor programirane celične smrti 1, PD-L1-ligand 1 za receptor programirane celične smrti 1, TCR-T-celični receptor. Povzeto po (153)

Figure 5: Role of PD-1 and PD-L1 in T-cell activation, exhaustion and effector function: A-T cells are activated by binding MHC plus peptide on an APC to the TCR and then binding an APC CD80/86 to T-cell CD28. Upon T-cell activation, PD-1 expression is induced. B-in chronic infection or persistent stimulation, PD-L1 signals through T-cell PD-1 to »turn off« T cells to minimize damage to healthy tissue. Tumour cells can upregulate PD-L1 to “turn off” T cells that might destroy them. C-blocking the PD-1/PD-L1 signaling pathway allows T cells to maintain their effector functions. In patients with cancer, activated tumour-specific T cells can kill tumour cells and secrete cytokines that activate/recruit other immune cells to participate in the antitumour response. APC-antigen-presenting cell, IFN- γ -interferon gamma, MHC-major histocompatibility complex, PD-1-programmed cell death-1, PD-L1-programmed cell death-1 ligand 1, TCR-T-cell receptor. Adapted from (153)

2.4 KAKOVOST ŽIVLJENJA PACIENTOV V VETERINARSKI MEDICINI

Kakovost življenja pacientov v veterinarski medicini ni natančno opredeljena; v literaturi zasledimo več razlag, na splošno pa pomeni vidike življenja živali, zaradi katerih je njihovo življenje boljše ali slabše (154). Kakovost življenja, povezana z zdravjem (HRQoL, angl. health-related quality of life), je ožji izraz, ki označuje specifičen vpliv zdravstvenega stanja na zdravje posameznika (155). V onkologiji HRQoL pomeni učinke raka in njegovega zdravljenja na delovanje telesa in počutje posameznika (42). Podatki o HRQoL lahko pomagajo pri sprejemanju odločitev o zdravljenju, zagotavljajo prognostične podatke, utrdijo odnos med lastnikom živali in veterinarjem ter pomagajo pri oceni vpliva novih zdravljenj v kliničnih raziskavah (42, 156).

V humani medicini je kakovost življenja že več kot petdeset let uveljavljena kot eden izmed glavnih ciljev in pomemben dejavnik pri odločanju v kliničnih raziskavah ter pri zdravljenju raka. V veterinarski medicini je področje kakovosti življenja postalo pomembno v zadnjih dveh desetletjih. V tem času so razvili vprašalnike za oceno HRQoL psov s kronično bolečino (154), nevrološkimi in mišično-skeletnimi boleznimi (157), poškodbami hrbtenjače (158), kardiološkimi obolenji (159, 160), debelostjo (161), sladkorno boleznijo (162), Cushingovim sindromom (163), epilepsijo (164, 165), kožnimi boleznimi (166, 167) in portosistemskim obvodom (168). Na področju veterinarske onkologije so ovrednotili HRQoL psov s tumorji mlečne žleze (169) in pri živalih z različnimi vrstami tumorjev (42), zdravljenih s kemoterapijo (170, 171), zaviralci tirozin kinaze (172) in obsevanjem (173, 174).

V humani medicini so že ocenjevali HRQoL pri bolnikih z rakom, zdravljenih z ireverzibilno elektroporacijo (175) in EKT (64), v veterinarski medicini pa so HRQoL nedavno ovrednotili pri psih z oralnim melanomom, zdravljenih z EKT (176).

3 MATERIAL IN METODE

Raziskave so potekale v okviru klinične študije "Kombinacija kirurgije ali elektrokemoterapije in genskega elektroprenosa gole plazmidne DNA z zapisom za pasji interlevkin-12 za zdravljenje oralnih in kožnih tumorjev psov" (dovoljenje št. U34401-24/2014/4). Lastniki psov so pred začetkom zdravljenja prejeli Pojasnilo lastniku (Priloga 1) in za sodelovanje v klinični študiji podpisali soglasje (Priloga 2).

3.1 FARMAKOKINETIKA BLEOMICINA V KRVI PSOV

3.1.1 Psi, vključeni v raziskavo

V raziskavo smo vključili 23 psov z različnimi histopatološko diagnosticiranimi tumorji, ki so bili zdravljeni z EKT z intravensko aplikacijo BLM (0,3 mg/kg t.m.) in GEP IL-12 (Tabela 1). Pse smo vključili v raziskavo, ko smo v skladu z operativnimi postopki EKT v veterinarski medicini (16) predvideli EKT z intravensko aplikacijo BLM.

Tabela 1: Psi, vključeni v raziskavo farmakokinetike BLM

Table 1: Dogs, included in the analysis of BLM pharmacokinetics

Št.	Pasma	Spol	Starost (leta)	Telesna masa (kg)	Telesna površina (m ²)	Vrsta tumorja
1	Ameriški staffordshirske terier	Ž	6	27,3	0,909	MCT
2	Ameriški staffordshirske terier	Ž	9	25,0	0,864	MCT
3	Mešanec	M	9	38,0	1,142	FSA
4	Bulterier	Ž	13	20,0	0,744	MCT
5	Nemški bokser	Ž	6	27,0	0,909	MCT
6	Francoski buldog	Ž	9	14,4	0,587	MCT

7	Nemški lovski terier	Ž	9	11,3	0,5	MCT
8	Mešanec	Ž	6	12,4	0,529	MCT
9	Koker španjel	M	10	11,0	0,5	OM
10	Mešanec	M	9	24,5	0,84	FSA
11	Mešanec	Ž	8	35,7	1,081	MCT
12	Mešanec	Ž	5	12,6	0,529	MCT
13	Labradorec	M	9	44,9	1,259	MCT
14	Mešanec	Ž	13	34,9	1,06	MCT
15	Weimarski ptičar	Ž	5	29,9	0,953	MCT
16	Baset	Ž	7	29,9	0,953	MCT
17	Veliki šnavcer	M	10	47,0	1,316	AHŽ
18	Beagle	Ž	10	17,3	0,668	MPNST
19	Pitbul	M	11	32,6	1,018	MCT
20	Labradorec	Ž	8	32,9	1,018	MCT
21	Senžermenski ptičar	Ž	10	29,8	0,953	HPC
22	Terier parson jack russell	M	13	10,0	0,469	MCT
23	Mali angleški hrt	Ž	11	10,8	0,469	HPC

BLM-bleomicin, M-moški, Ž-ženski, MCT-mastocitom, FSA-fibrosarkom, OM-oralni melanom, AHŽ-adenom hepatoidnih žlez, MPNST-maligni tumor ovojnici perifernih živcev, HPC-hemangiopericitom

BLM-bleomycin, M-male, Ž-female, MCT-mast cell tumour, FSA-fibrosarcoma, OM-oral melanoma, AHŽ-hepatoid gland adenoma, MPNST-malignant peripheral nerve sheath tumour, HPC-hemangiopericytoma

Vključeni so bili psi različnih pasem, spolov (16 samic, 7 samcev) in starosti (5 do 13 let, povprečna starost $9,1 \pm 2,4$ let) z različnimi histopatološko diagnosticiranimi tumorji. Prevladovali so psi z mastocitomi (16/23, 69,6 %), manj je bilo psov s fibrosarkomi (2/23, 8,7 %) in hemangiopericitomi (2/23, 8,7 %). Pri 3/23 (13 %) psov so bili ugotovljeni drugi tipi tumorjev. Psi so tehtali med 10,0 in 47,0 kg (povprečna telesna masa $24,7 \pm 2,0$ kg), njihova izračunana telesna površina (177) pa je bila med 0,469 in $1,316 \text{ m}^2$ (povprečna telesna površina $0,84 \pm 0,26 \text{ m}^2$).

Pse smo razdelili v skupine glede na:

- a) telesno maso: pse s telesno maso, manjšo ali enako 25 kg, smo uvrstili v skupino majhnih psov, tiste s telesno maso, večjo od 25 kg, pa v skupino velikih psov (178, 179).

b) starost, prilagojeno telesni masi: pse smo uvrstili v dve starostni skupini, prilagojeni njihovi telesni masi (Tabela 2). Razdelitev je bila povzeta po Cattai in sod. (180).

Tabela 2: Razdelitev psov glede na starost, prilagojeno telesni masi

Table 2: Distribution of dogs, according to the size-related age

Skupina	Telesna masa (kg)	Starost (leta)
Starejši psi	≤ 9	≥ 11
	9–25	≥ 10
	25–40	≥ 9
	> 40	≥ 8
Mlajši psi	≤ 9	< 11
	9–25	< 10
	25–40	< 9
	> 40	< 8

3.1.2 Protokol zdravljenja

Pred zdravljenjem smo tumor izmerili v treh pravokotnih projekcijah (a, b, c) in izračunali njegovo prostornino z enačbo:

$$V = a \times b \times c \times \pi \div 6$$

Pred prvim zdravljenjem smo psom iz *v. jugularis* ali *v. cephalice* odvzeli kri za meritve hematoloških in biokemijskih parametrov. Za meritve hematoloških parametrov (krvna slika z diferencialno belo krvno sliko) smo vzorce krvi odvzeli v 0,5-ml epruvete z dodanim antikoagulantom dikalijeva sol etildiamintetraocetne kisline (K₂EDTA, BD Microtainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, ZDA). Analizo smo opravili v eni uri po odvzemu vzorcev krvi z avtomatskim hematološkim analizatorjem (ADVIA 120, Siemens, München, Nemčija), ki deluje na principu pretočne citometrije z lasersko svetlobo in je namenjen za uporabo v veterinarski medicini.

Za pridobitev seruma, v katerem smo določili biokemijske parametre, smo vzorce krvi odvzeli v 4-ml epruvete z gelom in dodanim aktivatorjem koagulacije krvi (Vacuette, Greiner Bio-One International GmbH). Vzorce krvi smo pustili stati 30 minut pri sobni temperaturi in jih nato centrifugirali 10 minut pri 1300 x g pri sobni temperaturi. Serum smo uporabili za merjenje koncentracij glukoze, sečnine, kreatinina, skupnih beljakovin, albuminov, kalcija (Ca), natrija (Na), kalija (K), klorida (Cl) in aktivnosti alanin-aminotransferaze (ALT), aspartat-aminotransferaze (AST), alkalne fosfataze (ALP) ter kreatin kinaze (CK). Preiskave smo opravili v dveh urah po odvzemu krvnih vzorcev.

Biokemijske parametre, razen elektrolitov (Na, K, Cl), smo izmerili spektrofotometrično z avtomatskim biokemijskim analizatorjem (RX Daytona, Randox, Crumlin, Velika Britanija). Uporabili smo tovarniško izdelane reagenčne komplete (Randox).

Koncentracije Na, K in Cl smo izmerili z analizatorjem za elektrolite (ILyte, IL-Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, ZDA), ki deluje po principu ionoselektivnih elektrod.

V serumu smo, v dveh urah po odvzemu vzorcev, semikvantitativno določili tudi koncentracijo pasje pankreasne specifične lipaze, pri čemer smo uporabili hitri test (SNAP-cPL, Idexx, Westbrook, ME, ZDA), ki deluje na osnovi testa ELISA.

Poseg smo izvajali v splošni anesteziji. Psi smo premedicirali z intravensko (*i.v.*) aplikacijo midazolama (Midazolam Torrex, Torrex Pharma GesmbH, Dunaj, Avstrija; 0,1 mg/kg) in metadona (Comfortan, Dechra, Northwich, Velika Britanija; 0,2 mg/kg) ter uvedli v splošno anestezijo s propofolom (Norofol, Norbrook Laboratories, Newry, Severna Irska; 3–6 mg/kg *i.v.*). Anestezijo smo vzdrževali z 1,5–2 vol. % (nastavitev na hlapilniku) izoflurana (Isoflurin, Vetpharma Animal Health, Barcelona, Španija) v kisiku. Po uvodu v anestezijo smo psom aplicirali karprofen (Rycarfa, Krka, Novo mesto, Slovenija, 4 mg/kg *i.v.*). Med anestezijo so psi dobivali infuzijo 0,9%- NaCl (B. Braun, Melsungen, Nemčija) v odmerku 5 ml/kg/h. Psi so med anestezijo dihali spontano. Krvni pritisk smo neinvazivno merili z Dopplerjevim meriteljem krvnega tlaka (model 811, Parks Medical Electronics, Beaverton, OR, ZDA). Z večparametričnim monitorjem (BLT M9000 VET, Guangdong Biolight Meditech, Zhuhai, Kitajska) smo spremljali zasičenost hemoglobina arterijske krvi s kisikom (SpO₂), delni tlak ogljikovega dioksida na koncu izdiha (PE'CO₂), temperaturo požiralnika in elektrokardiografsko aktivnost srca.

3.1.2.1 Elektrokemoterapija

Psom smo po vzpostavitev splošne anestezije aplicirali BLM (Bleomycinum, Heinrich Mack Nachf, GmbH, Illertissen, Nemčija) v odmerku 0,3 mg/kg *i.v.*; 8 minut po aplikaciji BLM smo začeli z elektrodami na ali v tumor dovajati električne pulze (generator pulzov: Cliniporator, IGEA S.r.l., Carpi, Italija) (Slika 6).

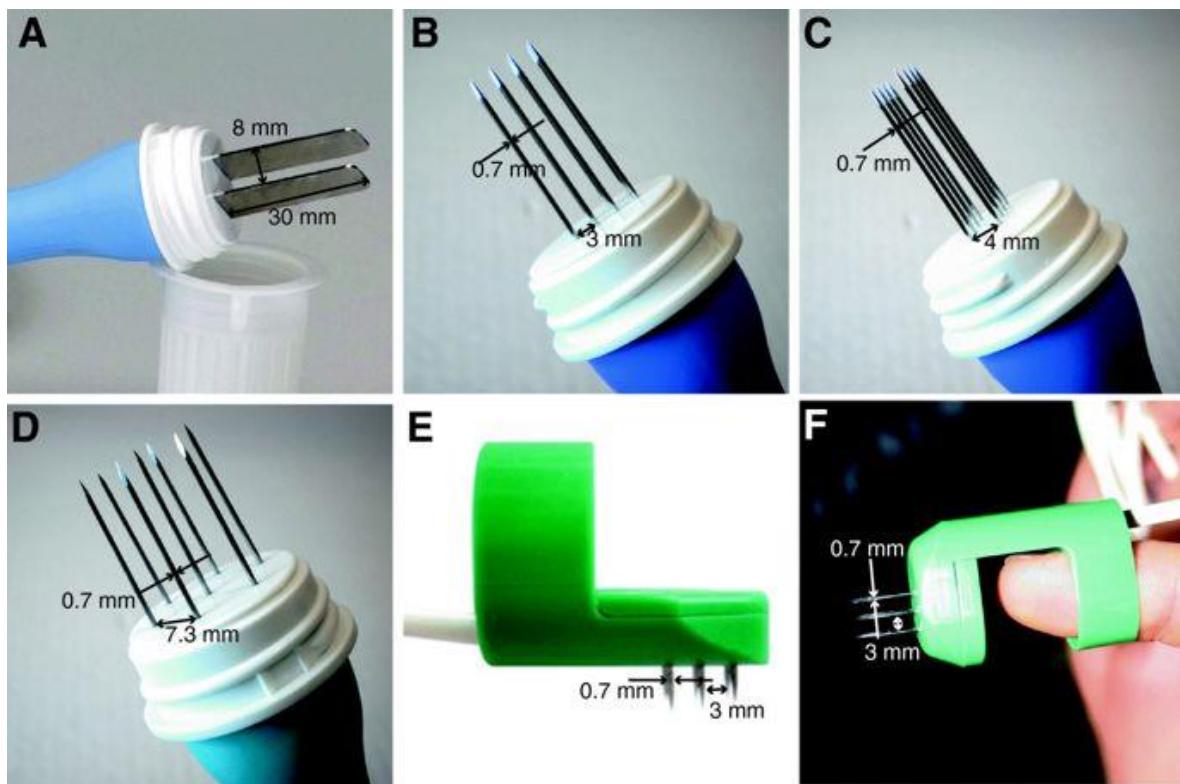


Slika 6: Generator električnih pulzov (Cliniporator, IGEA S.r.l.): Opremo sestavljata generator električnih pulzov z ekranom in stopalka za sprožanje električnih pulzov.

Figure 6: Generator of electrical pulses (Cliniporator, IGEA S.r.l.): The equipment consists of a generator of electrical pulses, a display and a footswitch for electrical pulse activation.

Izbira elektrod je bila prilagojena vsakemu pacientu posebej; pri majhnih in površinskih tumorjih smo uporabili ploščate elektrode (Slika 7A), medtem ko smo za globlje, večje ali infiltrativno rastoče tumorje uporabili linearne ali naprstne igelne (Slike 7B, 7C, 7E in 7F) ali heksagonalne igelne elektrode (Slika 7D). Parametri za dovajanje pulzov so bili naslednji: 8

unipolarnih električnih pulzov dolžine 100 μ s, razmerje med amplitudo in razmikom med elektrodama 1300 V/cm, frekvenca 5 kHz. Po dovajanju električnih pulzov smo parametre spremajali prek računalniškega programa, povezanega z generatorjem. Zdravljenje smo izvajali v skladu s standardnimi operativnimi postopki EKT (16).



Slika 7: Vrste elektrod, uporabljenih za EKT: A-ploščate elektrode, B, C-linearne igelne elektrode, D-heksagonalne igelne elektrode, E, F-naprstne igelne elektrode. Povzeto po (55)

Figure 7: Types of electrodes, used for ECT: A-plate electrodes, B, C-linear needle electrodes, D-hexagonal electrodes, E, F-finger electrodes with perpendicular needles. Adapted from (55)

3.1.2.2 Genski elektroprenos IL-12

Psom smo intradermalno na dve mestih v bližini tumorja injicirali 2 mg plazmida z zapisom za pasji IL-12 (pCMVcaIL-12), raztopljenega v vodi brez endotoksinov (Qiagen, Hilden, Nemčija). Električne pulze smo dovajali takoj po aplikaciji plazmida z MEA (angl. multi-electrode array) elektrodami (181). Parametri za dovajanje pulzov so bili naslednji: 24 pulzov dolžine 150 ms, razmerje med amplitudo in razmikom med elektrodama 170 V/cm, frekvenca 5,64 Hz.

Štiri tedne po zdravljenju smo tumor ponovno izmerili in glede na izračunano prostornino ocenjevali odgovor na zdravljenje po kriterijih RECIST (182). Odgovor na zdravljenje smo uvrstili v štiri skupine:

- popolni odgovor (CR, angl. complete response): izginotje tumorja,
- delni odgovor (PR, angl. partial response): vsaj 30-% zmanjšanje tumorja,
- stabilna bolezen (SD, angl. stable disease): zmanjšanje tumorja za manj kot 30 % ali povečanje za manj kot 20 %,
- napredovala bolezen (PD, angl. progressive disease): vsaj 20-% povečanje tumorja.

Kadar odgovora nismo definirali kot CR, smo EKT in GEP IL-12 ponovili čez 1–2 meseca, če je veterinar nadaljnje zdravljenje ocenil kot smiselno in je lastnik s tem soglašal.

3.1.3 Jemanje vzorcev krvi

Iz *v. jugularis* ali *v. cephalice* smo odvzeli vzorce krvi v 4-ml epruvete z dodanim aktivatorjem koagulacije krvi (Vacuette, Greiner Bio-One International GmbH) ob časovnih točkah tik pred aplikacijo in 5, 10, 20, 30 ter 60 ali 120 minut po aplikaciji BLM. Vzorce krvi smo pustili stati 30 minut pri sobni temperaturi in jih nato centrifugirali 10 minut pri 1300 x g pri sobni temperaturi. Serum smo odpipetirali v epruvete, zamrznili pri -20 °C in ga v enem mesecu analizirali na Institutu Jožefa Stefana (IJS).

3.1.4 Priprava in analiza vzorcev

Analizo smo opravili na Odseku za znanosti o okolju IJS.

Vzorce serumu smo pripravili za analizo z ekstrakcijo na trdni fazi z Oasis HLB 30 mg/1 ml kartušami (Waters Corp., Milford, MA, ZDA). Polimerno reverzno stacionarno fazo (sorbent) smo sprali z 1 ml metanola in uravnotežili z enakim volumnom 0,1%-mravljične kislino. 50 µl vzorca smo razredčili z 0,1%-mravljično kislino do 3 ml in filtrirali skozi 0,45 µl filtre iz

celuloznega acetata. Sledila je vezava na stacionarno fazo in sušenje (30 minut) pod vakuumom, BLM pa smo nato sprali z 0,5 ml raztopine MiliQ vode in metanola (6/4) ter dvakrat po 0,5 ml raztopine acetonitrila. Potem smo ekstrakte vzorcev koncentrirali do 1 ml z dušikom in jih zamrznili do analize, ki je bila opravljena v enem mesecu po pripravi. Epirubicin s končno koncentracijo 50 ng/ml smo uporabili kot interni standard, ki smo ga dodali ekstraktom vzorcev tik pred analizo.

BLM smo kvantitativno določili z LC-MS/MS, in sicer s tekočinskim kromatografom ultravisoke ločljivosti (Nexera X2, Shimadzu Corp., Japonska), sklopljenim s hibridnim kvadrupolnim masnim analizatorjem z detektorjem na zajetje ionov (QTRAP® 4500, Sciex, Nemčija). LC je bil opremljen z binarno črpalko in samodejnim vzorčevalnikom. Volumen injiciranega vzorca je bil 5 µl. Ločbo smo dosegli pri 40 °C z uporabo 5 cm Acquity UPLC® BEH Amide (Waters Corp.) kolone, z velikostjo delcev 1,7 µm in notranjim premerom 2,1 mm. Pri tem smo uporabili mobilni fazi: 10 mM amonijev format v 0,1 % mravljične kisline in acetonitril, s celokupno hitrostjo pretoka 0,3 ml/min. Začetni gradient je bil 95 % acetonitrila, ki se je v dveh minutah zmanjšal na 50 %, v naslednjih dveh minutah na 40 % ter nato nazaj na 95 % v 0,5 minute. Celotni čas ločbe je znašal 6 minut, pri čemer se je BLM izločil pri 2,5 min. BLM smo analizirali z ionizacijo v toku elektronov v pozitivnem načinu. Napetost na kapilari je znašala 5,5 kV. Določali smo bakrov kompleks frakcije A2 BLM, in sicer njegov kvantitativni prehod 738,4>707,2 ter dva potrditvena prehoda: 738,4>295,0, 738,4>514,7. Za bakrov kompleks frakcije B2 pa smo spremljali kvantitativni prehod 743,8>707,2 in dva potrditvena prehoda: 743,8>551,2, 743,8>334,0. Z validacijo analizne metode smo dokazali njeno selektivnost, občutljivost z mejo določanja pri 1 ng/ml, linearnost (koeficient R kvadrat (R^2) 0,99), natančnost s ponovljivostjo injiciranja 0,6 % relativnega standardnega odklona (RSD, angl. relative standard deviation) in ponovljivost metode 7,4 % RSD ter natančnost metode 6,1 % RSD.

3.1.5 Izračun farmakokinetičnih parametrov bleomicina

Določali smo naslednje farmakokinetične parametre:

- C_0 (koncentracija BLM v serumu v časovni točki 0) vrednost je bila izpeljana iz vrednosti naravnega logaritma (ln) koncentracije glede na časovne točke za vsakega

pacienta posebej in tudi za združene podatke. Območje pod krivuljo (AUC, angl. area under curve) smo izračunali s trapezoidno metodo od točke 0 do neskončnosti (∞) ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) in izračunali očistek (CL, angl. clearance) z enačbo:

$$CL = \text{odmerek (mg)} \div AUC_{0 \rightarrow \infty} (\text{mg} \times \frac{\text{min}}{\text{ml}})$$

Dobljene rezultate CL smo izrazili glede na telesno maso posameznega psa in na njegovo izračunano telesno površino (177).

- Konstanta hitrosti izločanja (k_{el}) je bila določena iz naklona ln koncentracije glede na časovno krivuljo. Razpolovni čas ($t_{1/2}$), tj. čas, v katerem se koncentracija zdravila v krvi zniža na polovico začetne vrednosti, smo izračunali z enačbo:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{el}}$$

- Porazdelitveni volumen (Vd) smo izračunali z enačbo:

$$Vd = (t_{1/2}(\text{min}) \times CL (\text{ml/min})) / 0,693$$

Dobljene rezultate Vd smo izrazili glede na telesno maso posameznega psa.

3.1.6 Statistična obdelava podatkov

Za statistično analizo smo uporabili programe SigmaPlot 11.0 (Systat Software, San Jose, CA, ZDA), SPSS 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ZDA) in GraphPad Prism 7.05 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, ZDA). Normalnost porazdelitve podatkov smo ugotavljali s Shapiro-Wilkovim testom. Razlike med skupinami smo ovrednotili s t-testom in z enosmerno analizo variance (ANOVA). Za vrednotenje stastistične povezanosti med starostjo in telesno maso psov ter farmakokinetičnimi parametri smo uporabili Pearsonov koeficient korelacije, vpliv starosti in telesne mase psov na farmakokinetične parametre pa smo ugotavljali tudi z linearno regresijo. Vrednosti $p < 0,05$ smo obravnavali kot statistično značilne.

3.2 DOLOČANJE SUBPOPULACIJ LIMFOCITOV V KRVI ZDRAVLJENIH PSOV

3.2.1 Psi, vključeni v raziskavo

V raziskavo smo vključili 29 psov različnih pasem, spolov (21 samic, 8 samcev) in starosti (5 do 15 let, povprečna starost $9,3 \pm 3,2$ let) (Tabela 3). Prevladovali so psi z mastocitomi (17/29, 58,6 %), preostali psi pa so imeli oralne melanome (10/29, 34,5 %) in kožne plazmacitome (2/29, 6,9 %). Vsi psi so bili zdravljeni s kombinacijo EKT in GEP IL-12.

Tabela 3: Psi, vključeni v raziskavo subpopulacij limfocitov v krvi

Table 3: Dogs, included in the analysis of lymphocyte subpopulations in the blood

Št.	Pasma	Starost (leta)	Spol	Vrsta tumorja
1	Koker španjel	9	Ž	OM
2	Mešanec	5	Ž	MCT
3	Koker španjel	15	Ž	CP
4	Mops	11	Ž	MCT
5	Maltežan	7	Ž	MCT
6	Zahodnovišavski beli terier	15	Ž	CP
7	Kavalir kralja Karla	10	Ž	OM
8	Irski seter	11	M	OM
9	Pes sv. Huberta	8	Ž	OM
10	Šarpej	9	M	OM
11	Mehkodlaki pšenični terier	13	M	OM
12	Koker španjel	14	Ž	OM
13	Nemški lovski terier	7	Ž	MCT
14	Nemški lovski terrier	15	Ž	OM
15	Beagle	6	Ž	MCT
16	Zlati prinašalec	10	M	OM
17	Aljaški malamut	7	Ž	MCT
18	Zahodnovišavski beli terier	6	Ž	MCT

19	Nemški bokser	7	Ž	MCT
20	Mešanec	7	Ž	MCT
21	Mešanec	8	M	MCT
22	Ameriški staffordshirski terier	9	Ž	MCT
23	Nemški bokser	6	Ž	MCT
24	Francoski buldog	10	Ž	MCT
25	Bernski planšarski pes	8	M	MCT
26	Gladkodlaki prinašalec	5	Ž	MCT
27	Bostonski terier	5	Ž	MCT
28	Francoski buldog	7	M	MCT
29	Koker španjel	10	M	OM

M-moški, Ž-ženski, MCT-mastocitom, CP-kožni plazmacitom, OM-oralni melanom

M-male, Ž-female, MCT-mast cell tumour, CP-cutaneous plasmacytoma, OM-oral melanoma

3.2.2 Protokol zdravljenja

Zdravljenje smo izvajali v splošni anesteziji, kot je opisano v poglavju 3.1.2. EKT smo izvajali v skladu s standardnimi operativnimi postopki (16). GEP IL-12 smo izvajali, kot je opisano v poglavju 3.1.2.2.

3.2.3 Jemanje vzorcev krvi

Psom smo iz *v. jugularis* ali *v. cephalice* odvzeli kri v 2-ml epruveto z antikoagulantom trikalijeva sol EDTA (K₃EDTA, Vacuette, Greiner Bio-One International GmbH) tik pred zdravljenjem, 4 tedne po zdravljenju in ob koncu opazovalnega obdobja (2 do 18 mesecev po zdravljenju). Kri smo shranili v hladilniku pri 2-8 °C in jo v 24 urah prenesli v laboratorij Oddelka za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta.

3.2.4 Izolacija mononuklearnih celic iz periferne krvi

Mononuklearne celice iz periferne krvi (PBMC, angl. peripheral blood mononuclear cells) smo izolirali s fikolom (Ficoll-PaqueTM Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedska) in uporabili epruvete SepMateTM (STEMCELL Technologies Inc., Kanada). 2 ml polne krvi smo redčili v fosfatnem pufru (PBS, angl. phosphate buffered saline) in razredčeno kri odpipetirali v epruveto SepMateTM, v katero smo predhodno vlili 4 ml fikola (Ficoll-PaqueTM Plus). Vzorce smo centrifugirali 10 minut s hitrostjo 301 x g (Heraeus MULTIFUGE 1S-R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, MA, ZDA). Vrhni sloj, ki je vseboval PBMC, smo prelili v novo epruveto in dodali enako količino raztopine PBS. Vzorce smo centrifugirali 5 minut s hitrostjo 470 x g (Heraeus MULTIFUGE 1S-R Centrifuge). Ločenemu sedimentu, ki je vseboval PBMC, smo dodali 1 ml medija za zamrzovanje brez seruma (Biological Industries, Beit HaEmek, Izrael) in ga v kriovialah zamrznili pri -80 °C. Pred začetkom pretočne citometrije smo vsebino kriovial za 1 minuto postavili v kopel s temperaturo 37 °C. Vsebino kriovial smo zmešali z 1 ml hladnega (2–8 °C) RPMI medija za celične kulture (Gipko, Life Technologies, CA, ZDA) in centrifugirali 5 minut s hitrostjo 1082 x g (Heraeus MULTIFUGE 1S-R Centrifuge). Sediment smo zmešali z 12 ml medija RPMI in vzorec 2 uri inkubirali v petrijevki pri temperaturi 37 °C. Nato smo vzorec centrifugirali 5 minut s hitrostjo 470 x g (Heraeus MULTIFUGE 1S-R Centrifuge). Sediment smo resuspendirali v 300 µl PBS in ga razdelili v tri epruvete (vsaka epruveta je vsebovala 100 µl celične suspenzije) za določanje imunofenotipa (subpopulacij limfocitov) s pretočnim citometrom.

3.2.5 Pretočna citometrija

Prvo epruveto smo uporabili za določanje odstotka levkocitov (CD45+), drugo za določanje deleža limfocitov T (CD3+) in tretjo za določanje deleža celic T pomagalk (CD4+), citotoksičnih limfocitov T (CD8+) in T_{reg} (CD4+CD25+Foxp3+). Celice smo označili s primerno količino površinskih protiteles (Tabela 4). Po 20-minutni inkubaciji suspenzije levkocitov s površinskimi protitelesi v temnem prostoru smo celice dvakrat sprali z raztopino PBS in centrifugirali 5 minut s hitrostjo 277 x g (Universal 32 centrifuge, Hettich, Kirchlengern,

Nemčija). Supernatant smo zavrgli in dodali 300 µl raztopine za fiksacijo (CellFIX, BD Biosciences, CA, ZDA).

Za določanje znotrajceličnega izražanja pasjega Foxp3 smo celice označili s protitelesi proti Foxp3 (Tabela 4). Celicam smo dodali 1 ml raztopine fiksacijskega in permeabilizacijskega pufrja (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set Kit, eBioscience, MA, ZDA). Po 90 minutah smo jih dvakrat sprali s permeabilizacijskim pufrom in dodali 5 µl raztopine protiteles Foxp3 ter 100 µl permeabilizacijskega pufra. Celice smo v temnem prostoru inkubirali 45 minut, dvakrat sprali z 2 ml permeabilizacijskega pufra in centrifugirali 5 minut s hitrostjo 277 x g (Hettich). Supernatant smo zavrgli in celicam dodali 200 µl raztopine PBS.

Tabela 4: Podatki o protitelesih, uporabljenih pri pretočni citometriji

Table 4: Antibody panel, used for flow cytometry

Specifičnost komercialnih protiteles	Kataloška oznaka protitelesa, proizvajalec	Fenotip označenih celic	Uporabljena količina
podganje mAb proti pasjemu CD45, klon YKIX716.13	11-5450-42, eBioscience	levkociti	5 µl
mišje mAb proti pasjemu CD3, klon CA17.2A12	MCA1774GA, Bio-Rad	limfociti T	5 µl
podganje mAb proti pasjemu CD8a, klon YCATE55.9	48-5080-42, eBioscience	citotoksični limfociti T	5 µl
podganje mAb proti pasjemu CD4, klon YKIX302.9	11-5040-42, eBioscience	celice T pomagalke	5 µl
mišje mAb proti pasjemu CD25, klon P4A10	12-0250-42, eBioscience	regulatorni limfociti T	5 µl
podganje mAb proti pasjemu Foxp3, klon FJK-16s	14-5773-82, eBioscience	regulatorni limfociti T	5 µl

mAb-monoklonsko protitelo

mAb-monoclonal antibody

Za pretočno citometrijo smo uporabili pretočni citometer FACSCanto (BD Biosciences) in dobljene podatke obdelali s programom BD FACSDiva (v. 8.0.1., BD Biosciences).

Tekom zdravljenja smo primerjali odstotke CD4+ in CD8+ limfocitov ter T_{reg} v krvi psov, poleg tega pa smo za vsakega psa v vseh časovnih točkah izračunali razmerje med odstotkoma CD8+ limfocitov in T_{reg} ($CD8+/T_{reg}$) v krvi.

Pse smo razdelili tudi v skupine glede na vrsto tumorja (10 psov z oralnimi melanomi in 17 z mastocitomi; psov s kožnimi plazmacitomi zaradi majhnega števila nismo vključili) in odgovor na zdravljenje (CR ali PR (18 psov) in PD (11 psov)). Med skupinami smo primerjali odstotke T_{reg} in razmerje CD8+/ T_{reg} v krvi tekom zdravljenja.

3.2.6 Statistična obdelava podatkov

Za grafične predstavitev in statistične analize smo uporabili program SigmaPlot 11.0 (Systat Software). Normalnost porazdelitve smo ugotavljali s Shapiro-Wilkovim testom. Če so bili podatki normalno porazdeljeni, smo razlike med preučevanimi skupinami statistično ovrednotili z enosmerno analizo variance (ANOVA), ki ji je sledil Holm-Sidakov test za večkratne primerjave. Podatke, ki so imeli normalno porazdelitev, smo predstavili s povprečnimi vrednostmi in pripadajočimi standardnimi odkloni. Če podatki niso bili normalno porazdeljeni, smo razlike med skupinami statistično ovrednotili s Kruskal-Wallisovim testom. Podatke, ki niso imeli normalne porazdelitve, smo predstavili z mediano in interkvartilnim razponom med prvim (Q1) in tretjim (Q3) kvartilom. Vrednosti $p < 0,05$ smo obravnavali kot statistično značilne.

3.3 IZRAŽANJE RECEPTORJEV IN LIGANDOV PROGRAMIRANE CELIČNE SMRTI 1 V TUMORJIH

3.3.1 Psi, vključeni v raziskavo

Vzorce tumorjev smo odvzeli 30 psom, ki so bili zdravljeni s kombinacijo EKT in GEP IL-12 (Tabela 5). Vključeni so bili psi različnih pasem, spolov (22 samic, 8 samcev) in starosti (5 do 14 let, povprečna starost $8 \pm 2,7$ let) z mastocitomi (21/30, 70 %) in oralnimi melanomi (9/30, 30 %). Na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele (IPDRČ) so stopnjo malignosti pri mastocitomih histopatološko ovrednotili po Patnaikovem (183) in Kiupelovem (184) sistemu. Po Patnaikovem sistemu so bili razvrščeni v tri stopnje malignosti: I (3/21, 14,3 %), II (15/21, 71,4 %) in III (3/21, 14,3 %). Večina mastocitomov (18/21, 85,7 %) je bila nizke stopnje malignosti po Kiupelovem sistemu, trije (3/21, 14,3 %) pa visoke stopnje malignosti. Psi so bili razvrščeni v štiri klinične stadije v skladu z navodili Svetovne zdravstvene organizacije (WHO, angl. World Health Organization) za določanje kliničnega stadija mastocitomov (185) in oralnih tumorjev (186). 18/30 (60 %) psov je bilo uvrščenih v klinični stadij 1, 5/30 (16,7 %) v klinični stadij 2, 5/30 (16,7 %) v klinični stadij 3 in 2/30 (6,7 %) v klinični stadij 4. Ob koncu opazovalnega obdobja (62 mesecev) je imelo 20/30 psov (67 %) popolni odgovor na zdravljenje (CR), od tega 19/20 (95 %) psov z mastocitomi. Pri 10/30 (33 %) psov je bolezen napredovala kljub zdravljenju, od tega je bilo 8/10 (80 %) oralnih melanomov (Priloga 7).

Tabela 5: Psi, vključeni v raziskavo PD-1/PD-L1

Table 5: Dogs, included in the PD-1/PD-L1 analysis

Št.	Pasma	Starost (leta)	Spol	Vrsta tumorja	Patnaik*	Kiupel**	KS
1	Mešanec	9	Ž	MCT	II	N	1
2	Nemški bokser	6	M	MCT	II	N	1
3	Nemški bokser	6	Ž	MCT	II	N	1
4	Ameriški staffordshirske terier	5	M	MCT	I	N	1
5	Bulterier	13	Ž	MCT	III	V	4

6	Aljaški malamut	7	Ž	MCT	II	N	1
7	Ameriški staffordshirski terier	6	Ž	MCT	II	N	1
8	Ameriški staffordshirski terier	9	Ž	MCT	II	N	4
9	Beagle	6	Ž	MCT	II	N	1
10	Mešanec	8	Ž	MCT	II	N	1
11	Francoski buldog	10	Ž	MCT	II	N	3
12	Mešanec	3	Ž	MCT	I	N	1
13	Gladkodlaki prinašalec	5	Ž	MCT	III	V	1
14	Bernski planšarski pes	8	M	MCT	II	N	1
15	Francoski buldog	7	M	MCT	I	N	1
16	Mešanec	7	Ž	MCT	III	V	1
17	Mešanec	7	Ž	MCT	II	N	3
18	Nemški lovski terier	7	Ž	MCT	II	N	3
19	Veliki angleški hrt	7	Ž	MCT	II	N	1
20	Bernski planšarski pes	7	Ž	MCT	II	N	1
21	Mešanec	4	Ž	MCT	II	N	1
22	Koker španjel	9	Ž	OM	-	-	1
23	Mehkodlaki pšenični terier	13	M	OM	-	-	3
24	Nemški lovski terier	14	Ž	OM	-	-	2
25	Kavalir kralja Karla	10	Ž	OM	-	-	3
26	Irski seter	8	M	OM	-	-	2
27	Koker španjel	9	M	OM	-	-	2
28	Pes sv. Huberta	8	Ž	OM	-	-	1
29	Koker španjel	14	Ž	OM	-	-	2
30	Šarpej	9	M	OM	-	-	2

M-moški, Ž-ženski, MCT-mastocitom, OM-oralni melanom, *-stopnja malignosti po Patnaikovem sistemu, **- stopnja malignosti po Kiupelovem sistemu, KS-klinični stadij, N-nizka stopnja malignosti, V-visoka stopnja malignosti

M-male, Ž-female, MCT-mast cell tumour, OM-oral melanoma, *-grade according to Patnaik system, **- grade according to Kiupel system, KS-clinical stage, N-low-grade, V-high-grade

3.3.2 Protokol zdravljenja

Zdravljenje smo izvajali v splošni anesteziji, kot je opisano v poglavju 3.1.2. EKT smo izvajali v skladu s standardnimi operativnimi postopki (16). GEP IL-12 smo izvajali, kot je opisano v poglavju 3.1.2.2.

3.3.3 Imunohistokemično barvanje

Vzorce tumorjev smo odvzeli z incizijsko ali ekscizijsko biopsijo in jih fiksirali v 10-% puferiranem formalinu. Na IPDRC so bili impregnirani s parafinom s tkivnima procesorjema Excelsior AS (Thermo Scientific[®]) in HypercenterXP (Shandon[®]). Z drsnim mikrotomom (Leica RM2235, Leica, Wetzlar, Nemčija) smo na Onkološkem inštitutu pripravili rezine debeline 4 µm.

Za imunohistokemično barvanje smo uporabili primarna poliklonska protitelesa proti človeškemu PD-1 in PD-L1. Pri vseh vzorcih smo eno rezino pobarvali brez primarnega protitelesa kot negativno kontrolo, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili bezgavko psa.

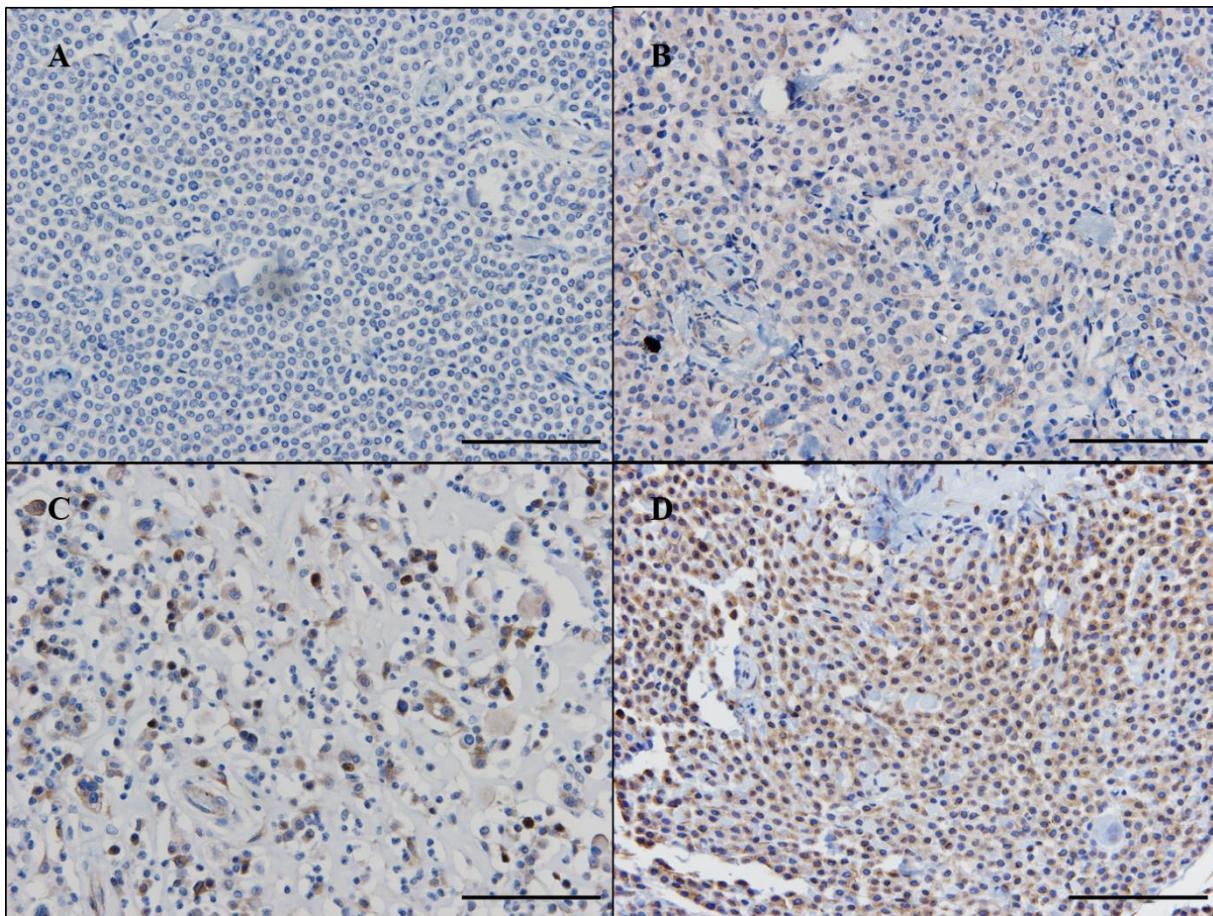
Za vizualizacijo imunohistokemičnega barvanja smo uporabili komercialno dostopen komplet za barvanje Rabbit-specific HRP/DAB detection IHC kit (ab64261, Abcam, Cambridge, Velika Britanija). Barvanje je bilo ročno, postopki so bili izvedeni po navodilih proizvajalca. Vzorce smo deparafinizirali v ksilolu (15 minut), 100-% etanolu (10 minut), 96-% etanolu (10 minut), 70-% etanolu (10 minut) in raztopini PBS (5 minut). Antigene smo izpostavili s 25-minutno inkubacijo vzorcev v vremenu 10mM Na-citratnem pufru (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA) z dodanim detergentom Tween[®]20 (0,05 %, VWR, West Chester, PA, ZDA) v mikrovalovni pečici. Po končanem vretju smo vzorce pustili 20 minut na sobni temperaturi (22 °C), da so se ohladili, in jih spirali v raztopini PBS (5 minut). Endogeno peroksidazo smo blokirali z 0,3-% vodikovim peroksidom (Hydrogen Peroxide Block, Abcam; 10 minut) in vzorce sprali z raztopino PBS (20 minut). Za zmanjšanje nespecifičnega barvanja ozadja smo uporabili reagent (Protein Block, Abcam), ki vsebuje kazein (0,5 %) in goveji serumski albumin (0,5 %); vzorce smo inkubirali 10 minut in jih ponovno sprali v raztopini PBS (10 minut).

Rezine smo inkubirali čez noč na 4 °C s kunčjimi protitelesi proti človeškemu PD-1 (PA5-32543, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ZDA, 1:250) in PD-L1 (ab233482, Abcam, 1:500). Po inkubaciji smo vzorce spirali z raztopino PBS (10 minut). Nato smo uporabili z biotinom označena sekundarna kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom (Biotinilated Goat Anti-Rabbit IgG, Abcam); vzorce smo inkubirali (10 minut) in jih sprali z raztopino PBS (10 minut). Na vzorce smo nanesli streptavidin peroksidazo (Abcam), jih inkubirali 10 minut in ponovno sprali z raztopino PBS (10 minut). Za detekcijo specifične reakcije smo uporabili kromogen DAB (3,3'Diaminobenzidine, Abcam), ki smo ga nakapali na vzorce in inkubirali 10 minut. Po inkubaciji smo vzorce sprali v raztopini PBS (15 minut). Sledilo je kontrastiranje s hematoksilinom, zaradi katerega so se jedra celic obarvala svetlo sivo-modro. Vzorce smo nato dehidrirali v 70-% (5 minut), 96-% (5 minut), 100-% (5 minut) etanolu in ksilolu (5 minut). Pobarvane preparate smo pokrili s sintetično smolo (Fisher Chemical™ Permount™ Mounting Medium, Thermo Fisher Scientific, MA, ZDA) in krovnim stekelcem.

Specifično reakcijo imunohistokemičnega barvanja smo zaradi barvnega substrata DAB videli kot rjav reakcijski produkt.

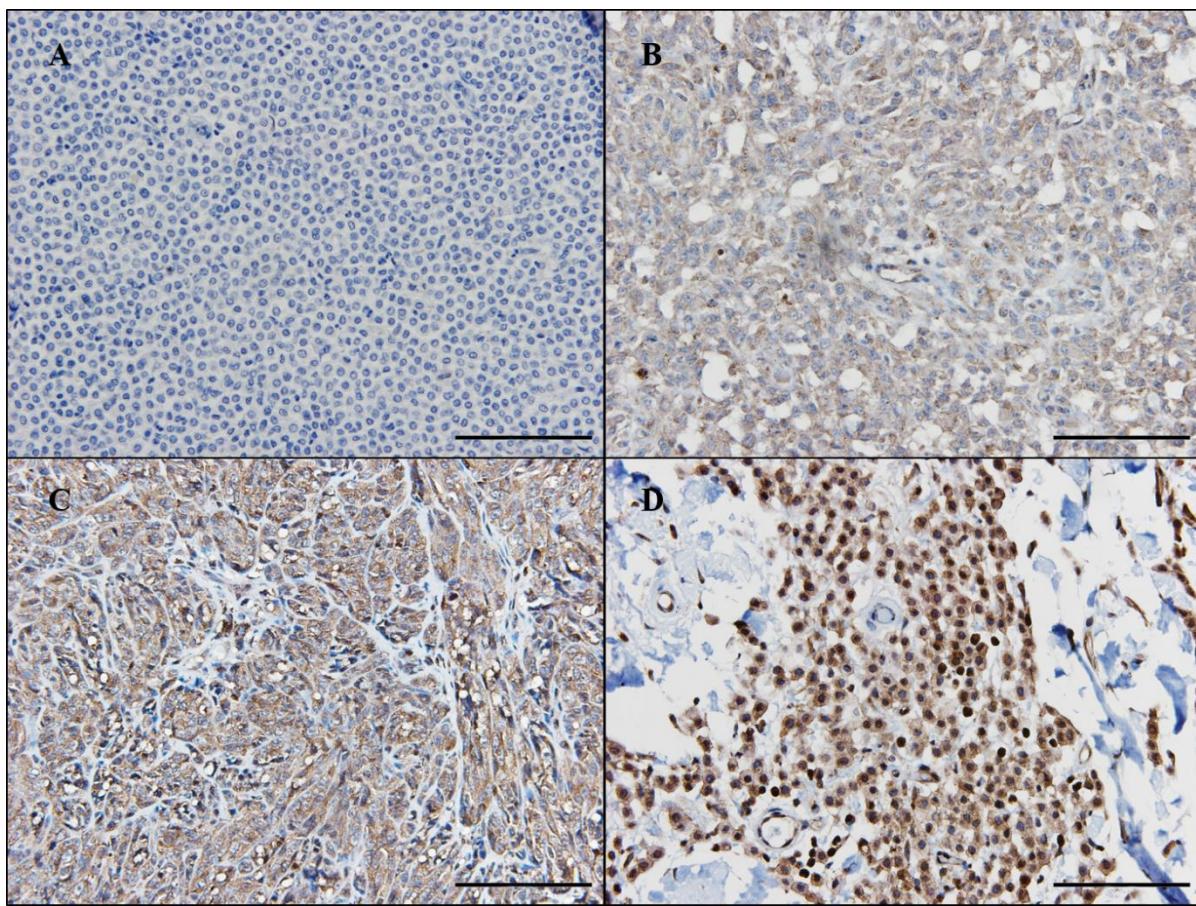
Preparate smo ocenjevali s svetlobnim mikroskopom (BX-51, Olympus, Hamburg, Nemčija). Pri vsakem vzorcu smo posneli vsaj pet naključnih vidnih polj tumorja s kamero (DP72 CCD Camera, Olympus), povezano z mikroskopom pri 400-kratni povečavi (objektiv s 40-kratno povečavo, numerična apertura objektiva 0,85). Obarvanje so neodvisno ocenjevali trije ocenjevalci, ki niso bili seznanjeni s podatki o pacientih.

Sistem ocenjevanja smo povzeli po Sampedro-Núñezu in sod. (187). Za vsakega izmed petih posnetkov vsakega preparata smo ocenili delež obarvanih celic od 0 do 4 (Slika 8) in jakost obarvanja od 0 do 3 (Slika 9). Skupni rezultat obarvanja smo pridobili s seštevkom ocen deleža obarvanih celic in jakosti obarvanja. Za končni rezultat obarvanja, t.i. izražanje PD-1/PD-L1 (od 0 do 7), smo izračunali povprečje ocen vseh treh ocenjevalcev.



Slika 8: Ocenjevanje deleža imunohistokemično obarvanih celic v tumorjih: A-< 5 % obarvanih celic (ocena 1), pacient št. 6 (MCT), B-6–25 % obarvanih celic (ocena 2), pacient št. 4 (MCT), C-26–50 % obarvanih celic (ocena 3), pacient št. 11 (MCT), D->50 % obarvanih celic (ocena 4), pacient št. 12 (MCT). Imunohistokemično barvanje s poliklonskim protitelesom proti človeškemu PD-1 (ThermoFisher Scientific), kontrastirano s hematoksilinom. MCT-mastocitom, OM-oralni melanom. Merilo = 100 µm

Figure 8: Assessment of the proportion of immunohistochemically stained cells in the tumours: A-<5% stained cells (1 point), patient no. 6 (MCT). B-6–25% stained cells (2 points), patient no. 4 (MCT). C-26–50% stained cells (3 points), patient no. 11 (MCT). D->50% stained cells (4 points), patient no. 12 (MCT). Immunohistochemical staining with polyclonal antibody against human PD-1 (Thermo Fisher Scientific), counterstained with hematoxylin. MCT-mast cell tumour, OM-oral melanoma. Scale bar = 100 µm



Slika 9: Ocenjevanje jakosti imunohistokemičnega obarvanja v tumorjih: A-brez obarvanja (ocena 0), pacient št. 6 (MCT), B-blago obarvanje (ocena 1), pacient št. 27 (OM), C-zmerno obarvanje (ocena 2), pacient št. 30 (OM), D-močno obarvanje (ocena 3), pacient št. 20 (MCT). Imunohistokemično barvanje s poliklonskim protitelesom proti človeškemu PD-L1 (Abcam), kontrastirano s hematoksilinom. MCT-mastocitom, OM-oralni melanom. Merilo = 100 µm

Figure 9: Assessment of the intensity of immunohistochemical staining in the tumours: A-negative staining (0 points), patient no. 6 (MCT), B-mild staining (1 point), patient no. 27 (OM), C-moderate staining (2 points), patient no. 30 (OM), D-intense staining (3 points), patient no. 20 (MCT). Immunohistochemical staining with polyclonal antibody against human PD-L1 (Abcam), counterstained with hematoxylin. MCT-mast cell tumour, OM-oral melanoma. Scale bar = 100 µm

Mejo med visokim in nizkim izražanjem smo postavili glede na mediano izražanja PD-1 in PD-L1 v vseh tumorjih (188).

3.3.4 Statistična obdelava podatkov

Za grafične predstavitev in statistične analize smo uporabili program SigmaPlot 11.0 (Systat Software). Za analizo osnovnih podatkov smo uporabili opisno statistiko. Normalnost porazdelitve smo ugotavljali s Shapiro-Wilkovim testom. Krivulje preživetja psov smo pridobili s Kaplan-Meierjevo analizo preživetja. Čas preživetja smo določili od dneva prvega zdravljenja do dneva pogina ali evtanazije oziroma do konca opazovalnega obdobja (62 mesecev). Pse, ki so bili na koncu raziskave še vedno živi, in tiste, ki so poginili zaradi vzrokov, nepovezanih s tumorjem, smo obdržali v raziskavi in jih v analizi preživetja cenzorirali. Za primerjavo deležev v skupinah smo uporabili tudi Fisherjev eksaktni test. Vrednosti $p < 0,05$ smo obravnavali kot statistično značilne.

3.4 KAKOVOST ŽIVLJENJA ZDRAVLJENIH PSOV

3.4.1 Psi, vključeni v raziskavo

V raziskavo smo vključili 44 psov različnih pasem, spolov (29 samic, 15 samcev) in starosti (5 do 16 let, povprečna starost $9,3 \pm 0,4$ let) z različnimi histopatološko diagnosticiranimi tumorji (Tabela 6). Prevladovali so psi z mastocitomi (30/44, 68,2 %), manj je bilo psov z oralnimi melanomi (4/44, 9,1 %), malignimi tumorji perifernih živčnih ovojnici (2/44, 4,5 %), oralnimi fibrosarkomomi (2/44, 4,5 %), kožnimi plazmacitomi (2/44, 4,5 %) in drugimi vrstami tumorjev (4/44, 9,2 %). Prostornina tumorjev je bila od 0 (rezidualna tumorska bolezen) do $64,1\text{ cm}^3$ (povprečna prostornina $7,1 \pm 12,5\text{ cm}^3$).

Pri večini psov smo za zdravljenje uporabili kombinacijo EKT in GEP IL-12 (27/44, 61,4 %). Kombinaciji je bilo v 18,2 % (8/44) dodano kirurško zdravljenje, samostojno zdravljenje smo uporabili v 9,1 % (4/44, GEP IL-12) in 4,5 % (2/44, EKT). V 4,5 % (2/44) smo uporabili kombinacijo kirurškega zdravljenja in GEP IL-12, v 2,3 % (1/44) pa smo kirurško zdravljenje kombinirali z EKT.

Tabela 6: Psi, vključeni v raziskavo HRQoL

Table 6: Dogs, included in the HRQoL analysis

Št.	Pasma	Starost (leta)	Spol	Vrsta tumorja	V (cm^3)	Zdravljenje
1	Mešanec	9	M	FSA	0,2	EKT
2	Beli švicarski ovčar	10	Ž	STS	R	KRG+EKT
3	Nemški bokser	6	M	MCT	2,5	EKT+GEP
4	Beagle	9	Ž	MCT	6,3	KRG+EKT+GEP
5	Mešanec	6	Ž	MCT	0,9	EKT+GEP
6	Ameriški staffordshirske terier	6	Ž	MCT	2,1	EKT+GEP
7	Nemški lovski terier	9	Ž	MCT	0,3	EKT+GEP
8	Zahodnovišavski beli terier	13	Ž	CP	0,4	EKT+GEP

9	Bulterier	13	Ž	MCT	14,7	EKT+GEP
10	Terier jack russell	6	Ž	MCT	3,5	KRG+EKT+GEP
11	Koker španjel	14	Ž	OM	3,1	KRG+GEP
12	Mops	10	Ž	MCT	0,8	EKT+GEP
13	Francoski buldog	10	M	MCT	1,1	EKT+GEP
14	Zlati prinašalec	10	M	OM	40,1	KRG+EKT+GEP
15	Francoski buldog	10	Ž	MCT	12,6	EKT+GEP
16	Maltežan	8	Ž	MCT	R	GEP
17	Angleški seter	15	M	OF	18,8	EKT+GEP
18	Pes sv. Huberta	9	Ž	OM	R	KRG+GEP
19	Bernski planšarski pes	8	M	MCT	15,4	KRG+EKT+GEP
20	Nemški bokser	8	Ž	MCT	R	GEP
21	Mešanec	10	M	MCT	5,9	EKT+GEP
22	Gladkodlaki prinašalec	8	Ž	HS	6,4	GEP
23	Ameriški staffordshirski terier	9	Ž	MCT	0,5	EKT+GEP
24	Staffordshirski bulterier	8	M	MCT	2,0	EKT+GEP
25	Aljaški malamut	8	Ž	MCT	0,1	EKT+GEP
26	Mešanec	11	Ž	MCT	18,8	EKT+GEP
27	Mešanec	12	Ž	MCT	64,1	GEP
28	Španski hrt	8	Ž	MCT	1,0	EKT+GEP
29	Shetlandski ovčar	11	Ž	MCT	R	EKT+GEP
30	Veliki angleški hrt	8	Ž	MCT	R	EKT+GEP
31	Bostonski terier	6	Ž	MCT	R	EKT+GEP
32	Zahodnovišavski beli terier	6	M	OF	27,8	KRG+EKT+GEP
33	Mešanec	10	Ž	MCT	0,4	EKT+GEP
34	Ameriški staffordshirski terier	14	Ž	SCC	9,8	KRG+EKT+GEP

35	Mehkodlaki pšenični terier	13	M	OM	15,7	KRG+EKT+ GEP
36	Mešanec	8	Ž	MCT	1,0	EKT+GEP
37	Ameriški koker španjel	16	Ž	CP	5,5	KRG+EKT+ GEP
38	Nemški bokser	7	Ž	MCT	0,1	EKT+GEP
39	Beagle	10	Ž	MPNST	23,0	EKT+GEP
40	Mešanec	9	Ž	MPNST	2,5	KRG+EKT+ GEP
41	Baset	6	Ž	MCT	2,6	EKT+GEP
42	Pritlikavi šnavcer	9	Ž	MCT	2,35	KRG+EKT+ GEP
43	Bostonski terier	5	Ž	MCT	0,13	EKT+GEP
44	Weimarski ptičar	6	Ž	MCT	0,11	EKT+GEP

V-prostornina, M-moški, Ž-ženski, FSA-fibrosarkom, STS-mehkotkvni sarkom, MCT-mastocitom, CP-kožni plazmacitom, OM-oralni melanom, OF-oralni fibrosarkom, HS-histiocitni sarkom, SCC-ploščatocelični karcinom, MPNST-maligni tumor ovojnici perifernih živcev, R-rezidualna bolezen, EKT-elektrokemoterapija, GEP-genski elektroprenos IL-12, KRG-kirurško zdravljenje
V-volume, M-male, Ž-female, FSA-fibrosarcoma, STS-soft tissue sarcoma, MCT-mast cell tumour, CP-cutaneous plasmacytoma, OM-oral melanoma, OF-oral fibrosarcoma, HS-histiocytic sarcoma, SCC-squamous cell carcinoma, MPNST-malignant peripheral nerve sheath tumour, R-residual disease, EKT-electrochemotherapy, GEP-IL-12 gene electrotransfer, KRG-surgery

Pse smo razdelili v skupine glede na:

a) vrsto zdravljenja (Tabela 7): v skupino »neinvazivno zdravljenje« smo vključili pse, ki so bili zdravljeni le z EKT in/ali GEP IL-12 (33/44, 75 %), v skupino »invazivno zdravljenje« pa pse, pri katerih smo v enem posegu po kirurški odstranitvi intraoperativno izvedli EKT in GEP IL-12 (11/44, 25 %);

Tabela 7: Vrste zdravljenj pri psih, vključenih v raziskavo HRQoL

Table 7: Treatment types in dogs, included in the HRQoL analysis

Skupina	Vrsta zdravljenja	n	%	
Neinvazivno zdravljenje	EKT+GEP	27	61,4	75,0
	GEP	4	9,1	
	EKT	2	4,5	
Invazivno zdravljenje	KRG+EKT+GEP	8	18,2	25,0
	KRG+GEP	2	4,5	
	KRG+EKT	1	2,3	

EKT-elektrokemoterapija, GEP-genski elektroprenos IL-12, KRG-kirurško zdravljenje

EKT-electrochemotherapy, GEP-IL-12 gene electrotransfer, KRG-surgery

b) velikost tumorja: tumorje z volumnom, manjšim ali enakim 3 cm^3 , smo opredelili kot »manjše« (27/44, 61,4 %), večje od 3 cm^3 pa kot »večje« (17/44, 38,6 %);

c) mesto tumorja: glede na mesto zdravljenega tumorja smo pse razdelili v skupini »oralni tumorji« (6/44, 13,6 %) in »kožni/podkožni tumorji« (38/44, 86,4 %);

d) odgovor na zdravljenje (Priloga 10): pse, pri katerih je prišlo do CR (31/44, 70,5 %) ali PR (5/44, 11,3 % psov), smo uvrstili v skupino »psi z objektivnim odgovorom na zdravljenje« (36/44, 81,8 %), tisti, pri katerih smo ocenili odgovor PD, pa so bili uvrščeni v skupino »psi, pri katerih je bolezen napredovala kljub zdravljenju« (8/44, 18,2 %).

3.4.2 Protokol zdravljenja

Zdravljenje smo izvajali v splošni anesteziji, kot je opisano v poglavju 3.1.2. EKT smo izvajali v skladu s standardnimi operativnimi postopki (16). GEP IL-12 smo izvajali, kot je opisano v poglavju 3.1.2.2.

3.4.3 Vprašalniki

Vprašalnik o kakovosti življenja psov (Priloga 3) je bil preveden in prilagojen na podlagi vprašalnika o kakovosti življenja živali z rakavimi obolenji (42). Poleg tega smo lastnikom razdelili tudi Kratki test za ocenjevanje vprašalnika (Priloga 4), katerega namen je bil ocenjevanje primernosti vprašalnika in pridobivanje predlogov lastnikov za morebitne izboljšave. Prvi del vprašalnika je bil sestavljen iz 21 vprašanj, ki so bila razvrščena v sedem sklopov (Veselje, Duševno stanje, Bolečina, Apetit, Splošni videz, Hidracija, Mobilnost) in namenjena ocenjevanju fizičnih in psiholoških vidikov zdravja živali. Vsak sklop je vseboval tri trditve, ki jih je lastnik ocenil na lestvici od 1 (se ne strinjam) do 5 (se strinjam). V drugem delu vprašalnika je bilo ocenjeno splošno zdravje od 1 (slabše) do 5 (boljše), ki so ga lastniki primerjali s stanjem pred zdravljenjem. Zadnje vprašanje je bila vizualna analogna skala (VAS), s katero je lastnik ocenil trenutno kakovost življenja svoje živali na lestvici od 1 (zelo slabo) do 10 (odlično). Vprašalniku, ki so ga zasnovali Lynch in sod. (42), smo dodali štiri vprašanja, ki so se nanašala na oskrbo zdravljenega področja in stroške zdravljenja. Vsebinsko veljavnost slovenske različice vprašalnika so potrdili trije strokovnjaki s področja veterinarske in humane onkologije. Notranja konsistentnost vprašalnika je bila sprejemljiva s koeficientom Cronbach α 0,6712.

Kratki test za ocenjevanje vprašalnika je sestavljalo osem vprašanj, ki so se nanašala na vsebino, dolžino, enostavnost, praktičnost in uporabnost Vprašalnika o kakovosti življenja. Sedmo vprašanje je bilo namenjeno ocenjevanju, ali so se lastniki zaradi vprašalnika počutili bolj vpete v zdravljenje svojih psov. V zadnjem vprašanju smo lastnike prosili za predloge glede sprememb vprašalnika.

Vprašalnik in kratki test so lastniki izpolnjevali vsaj en mesec po zdravljenju.

3.4.4 Statistična obdelava podatkov

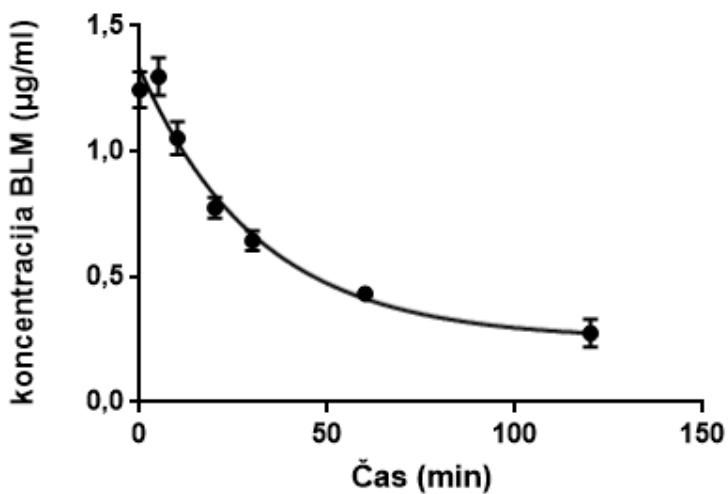
Za statistično analizo smo uporabili osnovno opisno statistiko in neparametrični Mann-Whitneyjev U test za ugotavljanje statistično značilnih razlik med kakovostjo življenja živali v različnih skupinah zdravljenih psov. Vrednosti $p < 0,05$ smo obravnavali kot statistično značilne.

4 REZULTATI

4.1 FARMAKOKINETIKA BLEOMICINA V KRVI PSOV

Vsi psi so imeli pred vključitvijo v raziskavo normalne vrednosti kreatinina v krvi, razen pacient št. 4, ki je imel blago povišano vrednost serumskega kreatinina (148,8 mmol/l, referenčna vrednost 44,2–132,6 mmol/l). Vrednosti drugih laboratorijskih preiskav so bile pri vseh vključenih psih v okviru referenčnih vrednosti.

Pet minut po intravenski aplikaciji BLM v odmerku 0,3 mg/kg telesne mase je bila povprečna serumska koncentracija BLM $1,299 \pm 0,075 \mu\text{g/ml}$. Koncentracija BLM je postopoma upadala s $k_{\text{el}} 0,032 \text{ min}^{-1}$ in po 60 minutah po aplikaciji dosegla $0,433 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$. AUC za združene podatke je bil $65,87 \pm 2,11 \mu\text{g min/l}$. Slika 10 prikazuje monofazno eliminacijsko krivuljo BLM v serumu psov. Farmakokinetični parametri so prikazani v Prilogi 5.



Slika 10: Eliminacijska krivulja BLM v krvi pri psih, zdravljenih z EKT: Pri psih ima po intravenski aplikaciji BLM monofazno serumsko eliminacijsko krivuljo. Točkovne označke prikazujejo povprečne vrednosti s pripadajočimi standardnimi odkloni. BLM-bleomicin

Figure 10: Elimination curve of BLM in the blood of dogs treated with ECT: In dogs, BLM has a monophasic serum elimination curve. The points represent mean values with corresponding standard errors of the mean. BLM-bleomycin

Izračunan povprečni Vd je bil $224,5 \pm 75,02$ ml/kg, CL $7,04 \pm 2,05$ ml/min/kg oz. $199,94 \pm 57,77$ ml/m²/min in t_{1/2} $22,03 \pm 0,88$ min.

V skupini majhnih psov je bil povprečni Vd $239,95 \pm 88,15$ ml/kg, pri velikih psih pa $210,34 \pm 61,10$ ml/kg. Majhni psi so imeli povprečni CL $7,30 \pm 2,58$ ml/min/kg oz. $176,76 \pm 57,24$ mg/min/m², veliki pa $6,81 \pm 0,43$ ml/min/kg oz. $221,19 \pm 51,63$ mg/min/m². Povprečni t_{1/2} v skupini majhnih psov je bil $23,09 \pm 3,95$ min, pri velikih psih pa $21,47 \pm 4,49$ min. Razlike med skupinami niso bile značilne ($p>0,05$).

Prav tako nismo ugotovili značilnih razlik v farmakokinetičnih parametrih, ko smo pse razdelili v skupine glede na starost, prilagojeno telesni masi. Mlajši psi so imeli nižji Vd ($215,08 \pm 75,07$ ml/kg) kot starejši psi ($234,79 \pm 77,20$ ml/kg) in manjši povprečni CL ($6,75 \pm 2,55$ ml/min/kg oz. $176,58 \pm 57,5$ ml/min/m²) v primerjavi s starejšimi ($7,37 \pm 1,36$ ml/min/kg oz. $219,62 \pm 51,63$ ml/min/m²). Skupina mlajših psov je imela nižji povprečni t_{1/2} ($23,13 \pm 4,02$ min) v kot skupina starejših psov ($21,28 \pm 4,42$ min). Razlike med skupinama niso bile značilne ($p>0,05$). Rezultati povprečnih vrednosti so prikazani v Tabeli 8.

Tabela 8: Povprečne vrednosti farmakokinetičnih parametrov BLM v krvi psov

Table 8: Mean values of pharmacokinetic parameters of BLM in the blood of dogs

	Vd (ml/kg)	CL (ml/min/kg)	CL (ml/min/m ²)	t _{1/2} (min)
Majhni psi (≤ 25 kg)	$239,95 \pm 88,15$	$7,30 \pm 2,58$	$176,76 \pm 57,24$	$23,09 \pm 3,95$
Veliki psi (> 25 kg)	$210,34 \pm 61,10$	$6,81 \pm 0,43$	$221,19 \pm 51,63$	$21,47 \pm 4,49$
Mlajši psi	$215,08 \pm 75,07$	$6,75 \pm 2,55$	$176,58 \pm 57,5$	$23,13 \pm 4,02$
Starejši psi	$234,79 \pm 77,20$	$7,37 \pm 1,36$	$219,62 \pm 51,63$	$21,28 \pm 4,42$

BLM-bleomicin, Vd-volumen distribucije, CL-očistek, t_{1/2}-razpolovni čas

BLM-bleomycin, Vd-volume of distribution, CL-clearance, t_{1/2}-elimination half-life

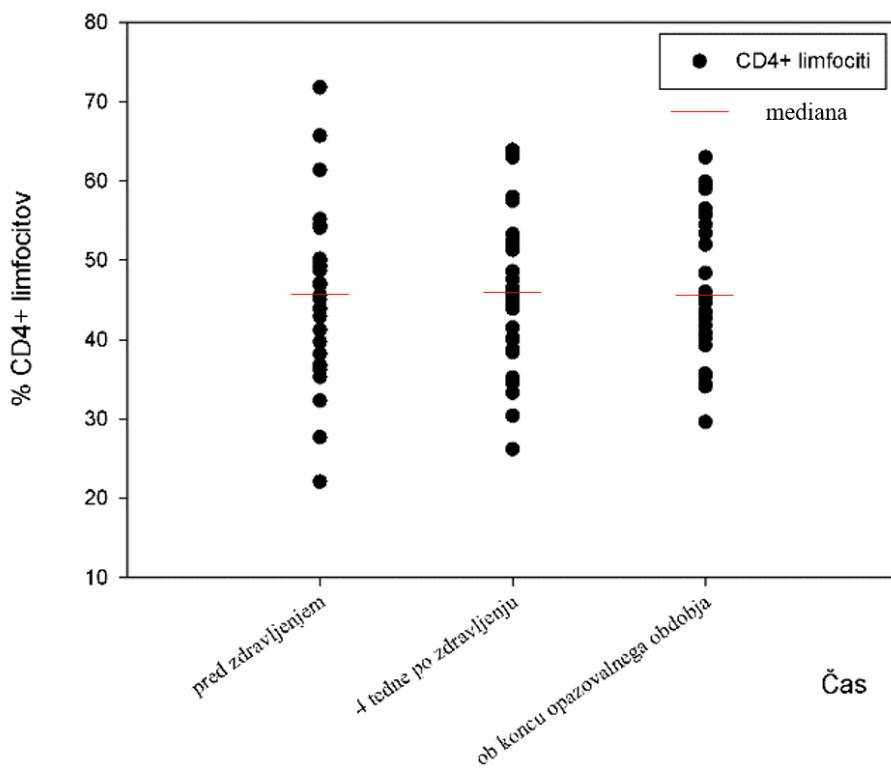
Ko smo pse znotraj starostnih skupin razvrstili glede na telesno maso, med njimi nismo ugotovili značilnih razlik v Vd, CL in t_{1/2} ($p>0,05$).

Za določanje povezanosti med starostjo ali telesno maso psov in farmakokinetičnimi parametri (Vd, CL in t_{1/2}) smo izračunali Pearsonov koeficient korelacije. Ugotovili smo negativno korelacijo med starostjo psov in Vd, saj so imeli mlajši psi višji Vd kot starejši ($p<0,05$), na CL in t_{1/2} pa ni vplivala. Prav tako telesna masa ni vplivala na t_{1/2}, CL ali Vd ($p>0,05$).

Za napovedovanje vpliva starosti in telesne mase psov na farmakokinetične parametre smo opravili linearno regresijo. Ugotovili smo, da starost psov vpliva na $t_{1/2}$ ($R^2=0,207$, $p<0,05$), na Vd in CL pa ne vpliva. Telesna masa psov ni značilno vplivala na $t_{1/2}$, CL ali Vd ($p>0,05$).

4.2 SUBPOPULACIJE LIMFOCITOV V KRVI ZDRAVLJENIH PSOV

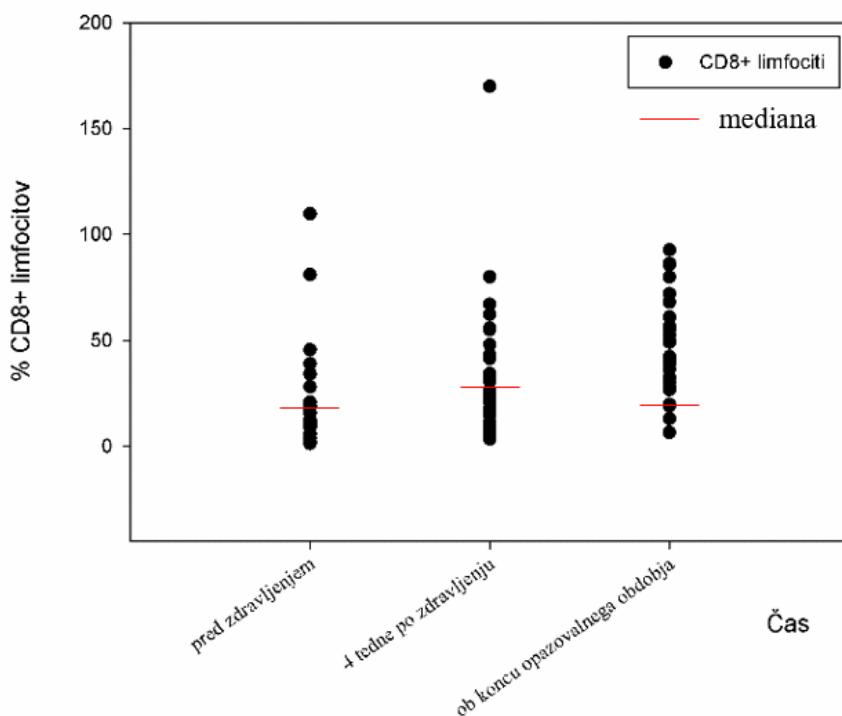
Tekom zdravljenja nismo ugotovili značilnih razlik v odstotku CD4+ limfocitov v krvi psov, zdravljenih z EKT in GEP IL-12 ($p>0,05$; Slika 11). Pred zdravljenjem je bila mediana 45,6 % (Q1: 37,5 %, Q3: 50,1 %), 4 tedne po zdravljenju 45,2 % (Q1: 39,4 %, Q3: 52,1 %) in ob koncu opazovalnega obdobja 45,0 % (Q1: 40,5 %, Q3: 55,1 %). Ko smo pse razvrstili v skupine glede na vrsto tumorjev, pri psih z mastocitomi in oralnimi melanomi nismo ugotovili značilnih razlik v odstotku CD4+ limfocitov tekom zdravljenja ($p>0,05$). Prav tako nismo ugotovili značilnih razlik v odstotku CD4+ limfocitov v dveh skupinah psov glede na odgovor na zdravljenje (CR/PR in PD; $p>0,05$).



Slika 11: Odstotek CD4+ limfocitov v krvi zdravljenih psov. Tekom zdravljenja ni bilo značilnih razlik v odstotku CD4+ limfocitov v krvi psov, zdravljenih z EKT in GEP IL-12 ($p>0,05$).

Figure 11: Percentage of CD4+ lymphocytes in the blood of treated dogs. No significant difference was found in the percentage of CD4+ lymphocytes in the blood of dogs treated with ECT and IL-12 GET ($p>0,05$).

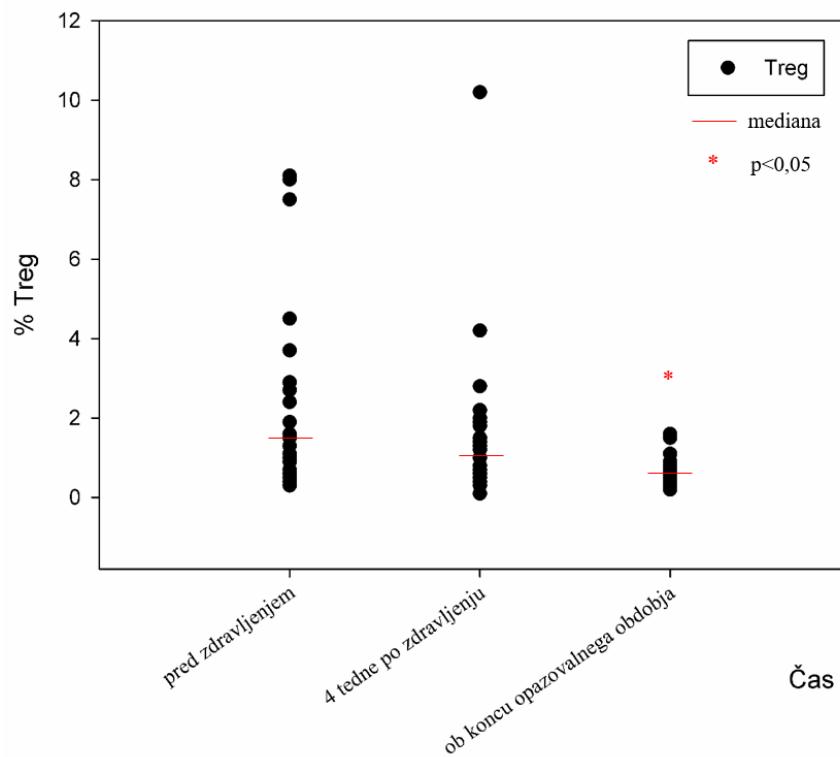
V odstotku CD8+ limfocitov tekom zdravljenja nismo zaznali značilnih razlik ($p>0,05$; Slika 12). Pred zdravljenjem je bila mediana 19,0 % (Q1: 14,0 %, Q3: 29,1 %), 4 tedne po zdravljenju 24,0 % (Q1: 17,0 %, Q3: 32,3 %) in ob koncu opazovalnega obdobja 21,6 % (Q1: 12,7 %, Q3: 27,4 %). Ko smo pse razvrstili v skupine glede na vrsto tumorjev, pri psih z mastocitomi in oralnimi melanomi nismo ugotovili značilnih razlik v odstotku CD8+ limfocitov tekom zdravljenja ($p>0,05$). Prav tako nismo ugotovili značilnih razlik v odstotku CD8+ limfocitov pri dveh skupinah psov glede na odgovor na zdravljenje (CR/PR in PD; $p>0,05$).



Slika 12: Odstotek CD8+ limfocitov v krvi zdravljenih psov. Tekom zdravljenja ni bilo značilnih razlik v odstotku CD8+ limfocitov v krvi psov, zdravljenih z EKT in GEP IL-12 ($p>0,05$).

Figure 12: Percentage of CD8+ lymphocytes in the blood of treated dogs. No significant difference was found in the percentage of CD8+ lymphocytes in the blood of dogs treated with ECT and IL-12 GET ($p>0,05$).

Tekom zdravljenja smo ugotovili značilen upad odstotka T_{reg} v krvi zdravljenih psov (Slika 13). Pred zdravljenjem je bila mediana 1,3 % (Q1: 0,7 %, Q3: 2,5 %), 4 tedne po zdravljenju 0,8 % (Q1: 0,5 %, Q3: 1,6 %) in ob koncu opazovalnega obdobja 0,5 % (Q1: 0,3 %, Q3: 0,8 %) (Priloga 6). Ob koncu opazovalnega obdobja je bil odstotek nižji v primerjavi s tistim pred zdravljenjem in štiri tedne po zdravljenju ($p<0,05$).



Slika 13: Odstotek T_{reg} v krvi zdravljenih psov. Ob koncu opazovalnega obdobia je bil odstotek T_{reg} v krvi zdravljenih psov značilno nižji v primerjavi z odstotkom pred zdravljenjem in štiri tedne po zdravljenju ($p<0,05$). T_{reg} -regulatorni limfociti T

Figure 13: Percentage of T_{reg} in the blood of treated dogs. There was a significant decrease in the percentage of T_{reg} in the blood of the treated dogs compared to the percentage before treatment and 4 weeks after treatment ($p<0,05$). T_{reg} -regulatory T cells

Ko smo pse razdelili v skupine glede na vrsto tumorja, smo v obeh skupinah (psi z oralnimi melanomi in psi z mastocitomi) ob koncu opazovalnega obdobia ugotovili značilen upad T_{reg} v primerjavi z odstotkom pred zdravljenjem ter štiri tedne po zdravljenju ($p<0,05$; Tabela 9).

Tabela 9: Mediana odstotka T_{reg} v krvi psov z mastocitomi in oralnimi melanomi

Table 9: Median T_{reg} percentage in the blood of dogs with oral melanomas and mast cell tumours

	% T_{reg}		
	Pred zdravljenjem	4 tedne po zdravljenju	Ob koncu opazovalnega obdobja
OM	1,2 % (Q1: 1,1 %, Q3: 3,1 %)	1,0 % (Q1: 0,5 %, Q3: 2,4 %)	0,4 % (Q1: 0,3 %, Q3: 1,0 %)
MCT	1,5 % (Q1: 0,6 %, Q3: 2,3 %)	1,0 % (Q1: 0,6 %, Q3: 1,5 %)	0,5 % (Q1: 0,3 %, Q3: 0,9 %)

% T_{reg} -regulatorni limfociti T, OM- oralni melanom, MCT- mastocitom, *p<0,05 (v primerjavi z odstotkom pred zdravljenjem in 4 tedne po zdravljenju)

% T_{reg} -regulatory T cells, OM- oral melanoma, MCT-mast cell tumour, *p<0,05 (compared to the percentage before treatment and 4 weeks after treatment)

Prav tako smo ob koncu opazovalnega obdobja ugotovili značilen upad T_{reg} v skupinah psov glede na odgovor na zdravljenje (CR/PR in PD) v primerjavi z odstotkom pred zdravljenjem ter štiri tedne po zdravljenju (p<0,05, Tabela 10).

Tabela 10: Mediana odstotka T_{reg} v krvi psov, razdeljenih v skupine glede na odgovor na zdravljenje

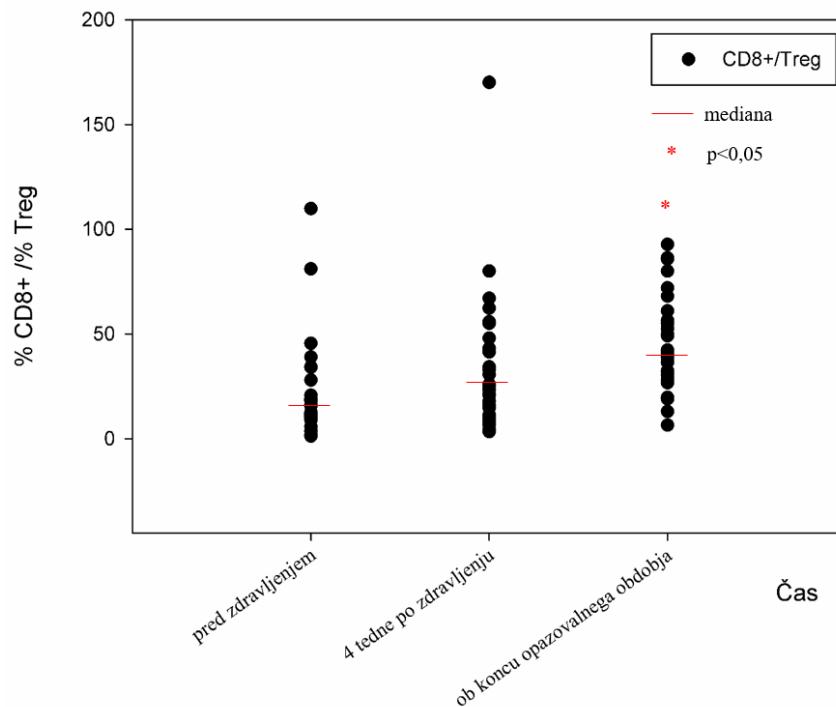
Table 10: Median T_{reg} percentage in the blood of dogs, grouped according to the treatment response

	% T_{reg}		
	Pred zdravljenjem	4 tedne po zdravljenju	Ob koncu opazovalnega obdobja
CR/PR	1,1 % (Q1: 0,6 %, Q3: 2,1 %)	0,8 % (Q1: 0,5 %, Q3: 1,3 %)	0,5 % (Q1: 0,3 %, Q3: 0,7 %)*
PD	1,3 % (Q1: 1,1 %, Q3: 3,7 %)	1,4 % (Q1: 0,5 %, Q3: 2,8 %)	0,5 % (Q1: 0,3 %, Q3: 0,9 %)*

% T_{reg} - regulatorni limfociti T, CR-popolni odgovor, PR-delni odgovor, PD-napredovala bolezen, *p<0,05 (v primerjavi z odstotkom pred zdravljenjem in 4 tedne po zdravljenju)

% T_{reg} - regulatory T cells, CR-complete response, PR-partial response, PD-progressive disease, *p<0,05 (compared to the percentage before treatment and 4 weeks after treatment)

Ob koncu opazovalnega obdobja smo ugotovili značilno povišanje razmerja CD8+/ T_{reg} v krvi psov v primerjavi z vrednostjo pred zdravljenjem (p<0,05; Slika 14). Pred zdravljenjem je bila mediana 16,1 (Q1: 10,5, Q3: 22,5), 4 tedne po zdravljenju 23,3 (Q1: 13,9, Q3: 44,3) in ob koncu opazovalnega obdobja 42,3 (Q1: 29,7, Q3: 62,8).



Slika 14: Razmerje CD8+/T_{reg} v krvi zdravljenih psov. Ob koncu opazovalnega obdobja je bilo razmerje med odstotkoma CD8+ limfocitov in T_{reg} v krvi zdravljenih psov značilno višje v primerjavi z odstotkom pred zdravljenjem ($p < 0,05$). T_{reg}-regulatorni limfociti T, CD8+-citotoksični limfociti T

Figure 14: CD8+/T_{reg} ratio in blood of treated dogs. There was a significant decrease in T_{reg}/CD8+ ratio in the blood of the treated dogs compared to the ratio before treatment ($p < 0,05$). T_{reg}-regulatory T cells, CD8+-cytotoxic T lymphocytes

Ko smo pse razdelili v skupine glede na vrsto tumorja, smo ob koncu opazovalnega obdobja v obeh skupinah (psi z oralnimi melanomi in psi z mastocitomi) ugotovili značilno povišanje razmerja CD8+/T_{reg} v primerjavi z vrednostjo pred zdravljenjem ($p < 0,05$, Tabela 11).

Tabela 11: Mediana razmerja CD8+/T_{reg} v krvi psov z mastocitomi in oralnimi melanomi

Table 11: Median CD8+/T_{reg} ratio in the blood of dogs with oral melanomas and mast cell tumours

	CD8+/T_{reg}		
	Pred zdravljenjem	4 tedne po zdravljenju	Ob koncu opazovalnega obdobja
OM	14,3 (Q1: 7,2, Q3: 18,6)	20,0 (Q1: 7,9, Q3: 37,7)	39,6 (Q1: 18,0, Q3: 58,5)*
MCT	18,8 (Q1: 10,8, Q3: 36,7)	23,3 (Q1: 15,7, Q3: 55,4)	52,5 (Q1: 33,4, Q3: 82,9)*

CD8+-citotoksični limfociti T, T_{reg}-regulatorni limfociti T, OM- oralni melanom, MCT- mastocitom, *p<0,05 (v primerjavi z odstotkom pred zdravljenjem)

CD8+-cytotoxic T lymphocytes, T_{reg}-cytotoxic T cells, OM- oral melanoma, MCT-mast cell tumour, *p<0,05 (compared to the percentage before treatment)

Prav tako smo ob koncu opazovalnega obdobja ugotovili značilno povišanje razmerja CD8+/T_{reg} v skupinah psov glede na odgovor na zdravljenje (CR/PR in PD) v primerjavi z vrednostjo pred zdravljenjem (p<0,05, Tabela 12).

Tabela 12: Mediana razmerja CD8+/T_{reg} v krvi psov, razdeljenih v skupine glede na odgovor na zdravljenje

Table 12: Median CD8+/T_{reg} ratio in the blood of dogs, grouped according to their treatment response

	CD8+/T_{reg}		
	Pred zdravljenjem	4 tedne po zdravljenju	Ob koncu opazovalnega obdobja
CR/PR	18,4 (Q1: 10,5, Q3: 35,5)	22,3 (Q1: 14,5, Q3: 56,8)	45,7 (Q1: 31,4, Q3: 81,4)*
PD	12,5 (Q1: 9, Q3: 19)	25,0 (Q1: 8,2, Q3: 34,3)	41,3 (Q1: 19,7, Q3: 55,3)*

CD8+-citotoksični limfociti T, T_{reg}-regulatorni limfociti T, CR-popolni odgovor, PR-delni odgovor, PD-napredovala bolezen, *p<0,05 (v primerjavi z odstotkom pred zdravljenjem)

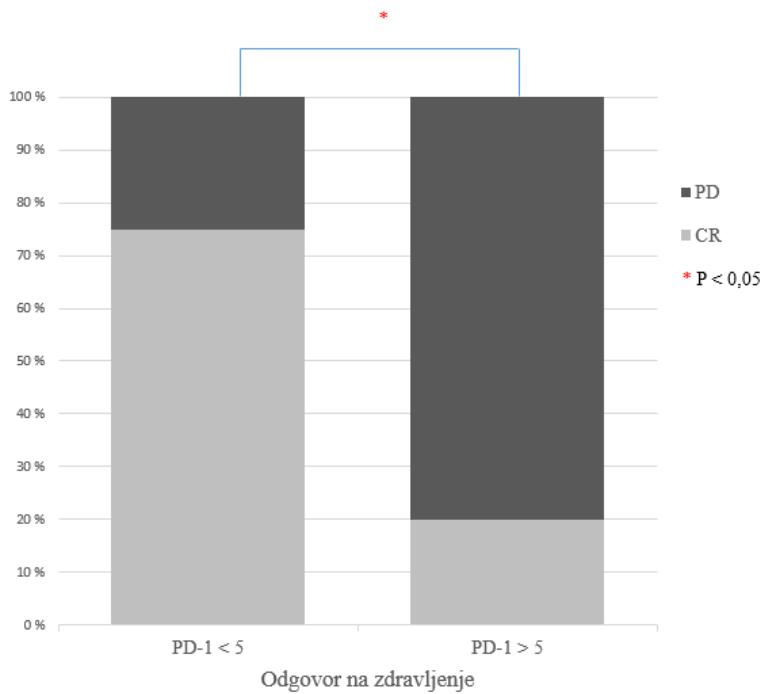
CD8+-cytotoxic T lymphocytes, T_{reg}-cytotoxic T cells, CR-complete response, PR-partial response, PD-progressive disease, *p<0.05 (compared to the percentage before treatment)

4.3 IZRAŽANJE RECEPTORJEV IN LIGANDOV PROGRAMIRANE CELIČNE SMRTI 1 V TUMORJIH

PD-1 je izražalo 20/21 (95,2 %) mastocitomov in vseh 9 (9/9, 100 %) oralnih melanomov, PD-L1 pa so izražali vsi tumorji (Priloga 7). Mediana izražanja PD-1 je bila 4,8 (Q1: 3,1, Q3: 5,2), PD-L1 pa 5,2 (Q1: 4,6, Q3: 5,7). Mastocitomi so izražali manj PD-1 (mediana 4,1, Q1: 2,9, Q3: 5,2) in PD-L1 (mediana 4,9, Q1: 4,5, Q3: 5,9) kot oralni melanomi, pri katerih je bilo izražanje PD-1 (mediana 5,0, Q1: 4,7, Q3: 5,2) in PD-L1 (mediana 5,3, Q1: 5,1, Q3: 5,7) višje. Razlike v izražanju PD-1 in PD-L1 med vrstama tumorjev niso bile značilne ($p>0,05$).

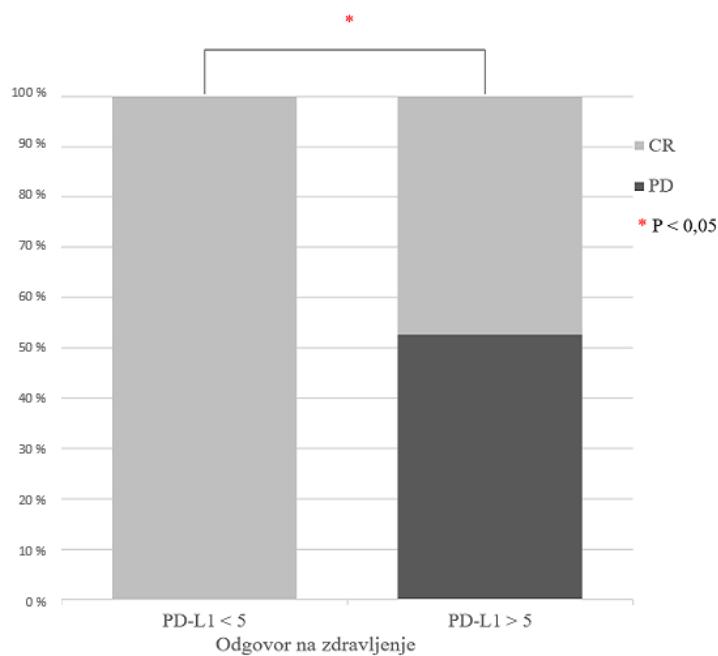
Glede na mediano izražanja PD-1 in PD-L1 smo postavili mejo med nizkim in visokim izražanjem. Če so tumorji izražali PD-1 ali PD-L1 v vrednosti manj ali enako 5, smo jih uvrstili v skupino z nizkim izražanjem; če je bilo skupno točkovanje večje od 5, smo jih uvrstili v skupino z visokim izražanjem. V skupino z nizkim izražanjem PD-1 je bilo uvrščenih 17/30 (56,7 %) psov (14 z mastocitomi in 3 z oralnimi melanomi), v tisti z visokim izražanjem pa je bilo 13/30 (43,3 %) psov (7 z mastocitomi in 6 z oralnimi melanomi) (Priloga 8). V skupino z nizkim izražanjem PD-L1 je bilo uvrščenih 11/30 (36,7 %) psov (vsi z mastocitomi), v tisto z visokim izražanjem pa 19/30 (63,3 %; 10 z mastocitomi in 9 z oralnimi melanomi) (Priloga 9).

Psi s tumorji z visokim izražanjem PD-1 in PD-L1 so imeli krajsi povprečni čas preživetja in krajsje preživetje brez napredovanja bolezni (PFS, angl. progression-free survival) kot tisti z nizkim izražanjem PD-1 in PD-L1 ($p<0,05$). Prav tako so imeli psi s tumorji z visokim izražanjem PD-1 in PD-L1 slabši odgovor na zdravljenje, saj je pri njih bolezen pogosteje napredovala kot pri tistih z nizkim izražanjem PD-1 in PD-L1 ($p<0,05$) (Sliki 15 in 16).



Slika 15: Odgovor na zdravljenje v skupinah psov s tumorji z nizkim in visokim izražanjem PD-1. Pri psih s tumorji z visokim izražanjem PD-1 (> 5 točk) je bolezen pogosteje napredovala kot pri tistih s tumorji z nizkim izražanjem PD-1 (< 5 točk). CR-popolni odgovor, PD-napredovala bolezen, PD-1-receptor programirane celične smrti 1, *-značilna razlika med skupinama in napredovanjem bolezni glede na izražanje PD-1 ($p<0,05$)

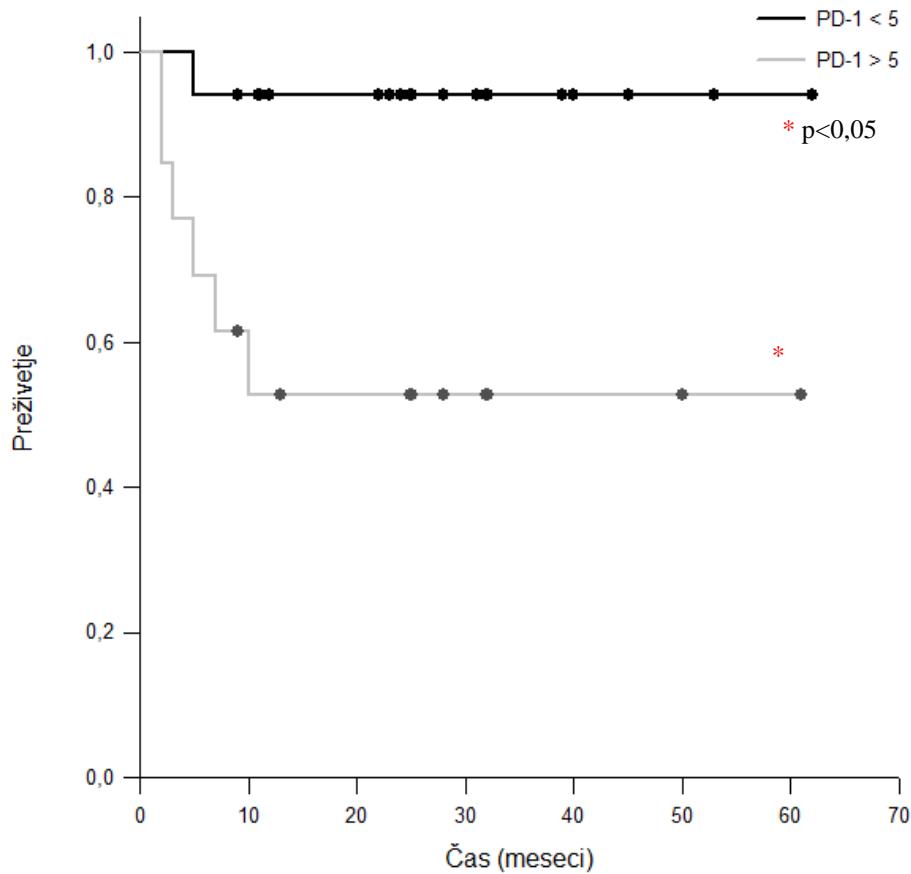
Figure 15: Treatment response in dogs with tumours with high and low PD-1 expression. In dogs with tumours with high PD-1 expression (> 5 points), PD was more common than in dogs with tumours with low PD-1 expression (< 5 points). CR-complete response, PD-progressive disease, PD-1-programmed cell death-1, *-significant difference between the groups and progression of the disease, according to PD-1 expression ($p<0.05$)



Slika 16: Odgovor na zdravljenje v skupinah psov s tumorji z nizkim in visokim izražanjem PD-L1. Pri psih s tumorji z visokim izražanjem PD-L1 (> 5 točk) je bolezen pogosteje napredovala kot pri tistih s tumorji z nizkim izražanjem PD-L1 (< 5 točk). CR-popolni odgovor, PD-napredovala bolezen, PD-L1-ligand 1 za receptor programirane celične smrti 1, *-značilna razlika med skupinama in napredovanjem bolezni glede na izražanje PD-L1 ($p<0,05$)

Figure 16: Treatment response in dogs with tumours with high and low PD-L1 expression. In dogs with tumours with hig PD-L1 expression (> 5 points), PD was more common than in dogs with tumours with low PD-L1 expression (< 5 points). CR-complete response, PD-progressive disease, PD-L1-programmed cell death-1 ligand 1, *-significant difference between the groups and progression of the disease, according to PD-L1 expression ($p<0.05$)

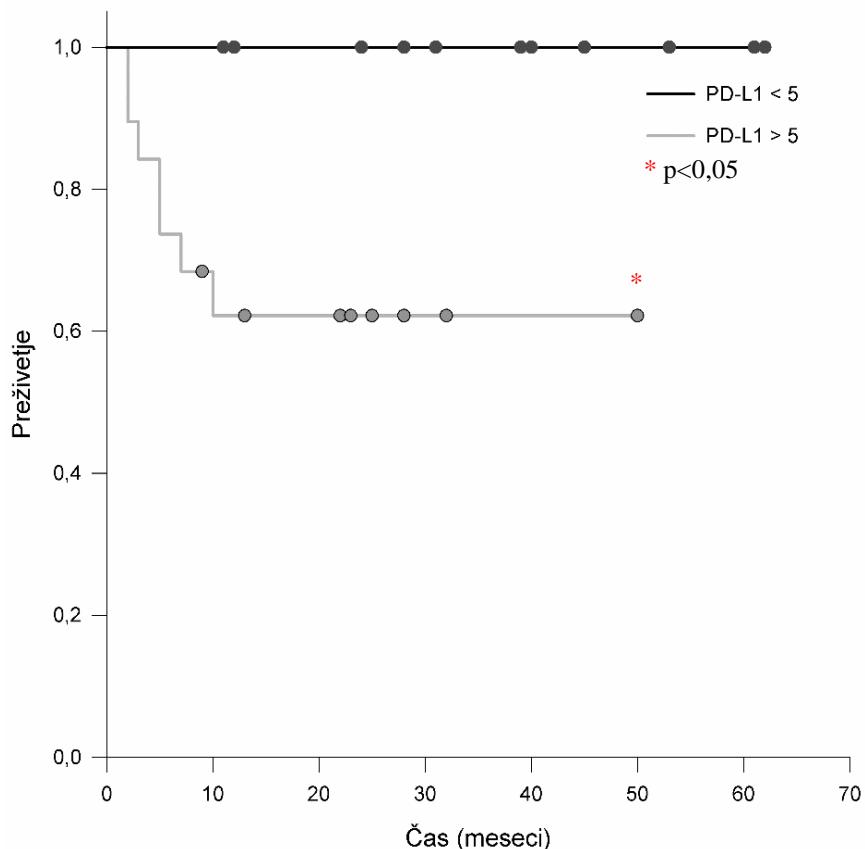
Povprečni čas preživetja v skupini z nizkim izražanjem PD-1 je bil 58,6 meseca, v skupini z visokim izražanjem PD-1 pa 34,5 meseca. Slika 17 prikazuje Kaplan-Meierjevo krivuljo preživetja psov s tumorji z visokim in nizkim izražanjem PD-1.



Slika 17: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja psov s tumorji z nizkim in visokim izražanjem PD-1. Skupina psov s tumorji z visokim izražanjem PD-1 (> 5 točk) je imela značilno krajši povprečni čas preživetja kot tista s tumorji z nizkim izražanjem PD-1 (< 5 točk). PD-1-receptor programirane celične smrti 1, * $p<0,05$

Figure 17: Kaplan-Meier survival curve of dogs with tumours with low and high PD-1 expression. The mean survival time in the group of dogs with tumours with high PD-1 expression (> 5 points) was significantly shorter than that in the group with tumours with low PD-1 expression (< 5 points). PD-1-programmed cell death-1, *- $p<0.05$

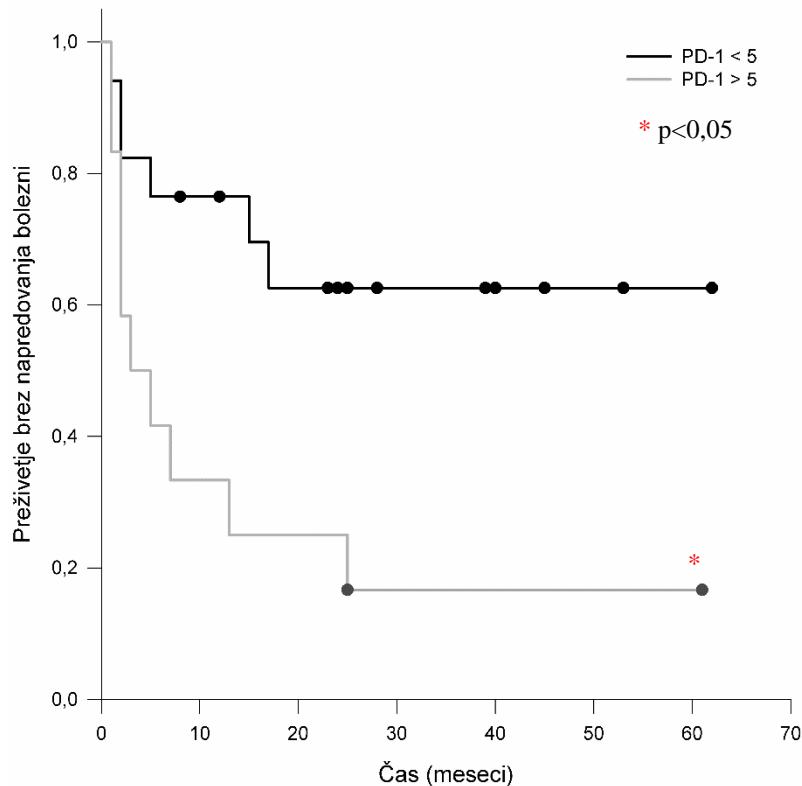
V skupini z visokim izražanjem PD-L1 je bil povprečni čas preživetja 33 mesecev, v skupini z nizkim izražanjem PD-L1 pa zaradi velikega števila cenzoriranih podatkov ni bil dosežen. Slika 18 prikazuje Kaplan-Meierjevo krivuljo preživetja psov s tumorji z visokim in nizkim izražanjem PD-L1.



Slika 18: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja psov s tumorji z nizkim in visokim izražanjem PD-L1. Skupina psov s tumorji z visokim izražanjem PD-L1 (> 5 točk) je imela značilno krajši povprečni čas preživetja kot tista s tumorji z nizkim izražanjem PD-L1 (< 5 točk). PD-L1-ligand 1 za receptor programirane celične smrti 1, $* - p < 0,05$

Figure 18: Kaplan-Meier survival curve of dogs with tumours with low and high PD-L1 expression. The mean survival time in the group of dogs with tumours with high PD-L1 expression (> 5 points) was significantly shorter than that in the group with tumours with low PD-L1 expression (< 5 points). PD-L1-programmed cell death-1 ligand 1, $* - p < 0,05$

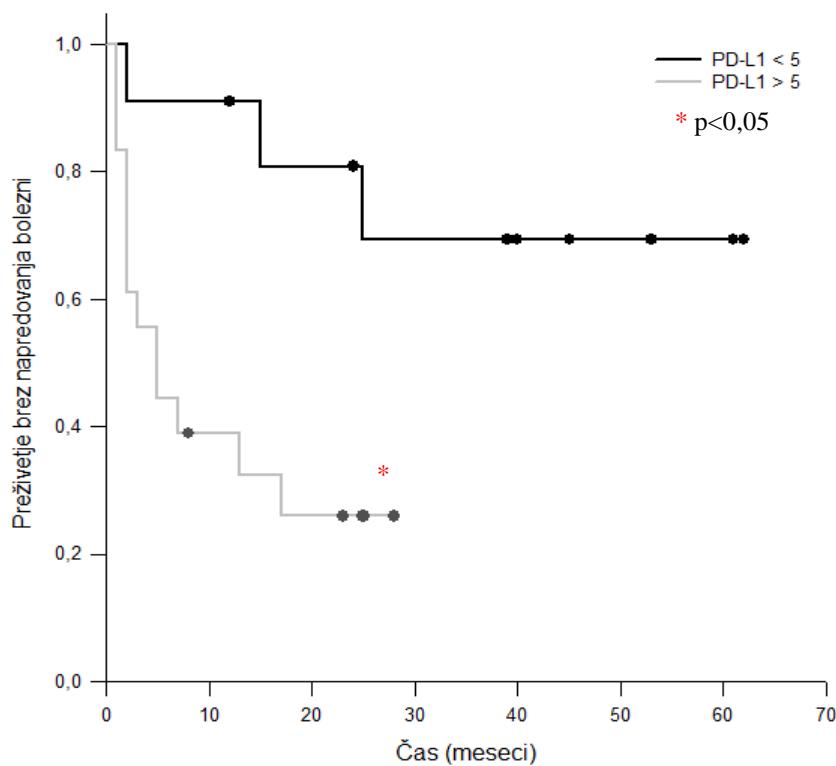
Značilne razlike smo ugotovili tudi pri PFS; povprečno PFS je bilo v skupini z nizkim izražanjem PD-1 41,6 meseca, v skupini z visokim izražanjem PD-1 pa 15,3 meseca. Slika 19 prikazuje Kaplan-Meierjevo krivuljo PFS psov s tumorji z visokim in nizkim izražanjem PD-1.



Slika 19: Kaplan-Meierjeva krivulja PFS psov s tumorji z nizkim in visokim izražanjem PD-1. Skupina psov s tumorji z visokim izražanjem PD-1 (> 5 točk) je imela značilno krajše povprečno PFS kot tista s tumorji z nizkim izražanjem PD-1 (< 5 točk). PFS-preživetje brez napredovanja bolezni, PD-1-receptor programirane celične smrti 1, *- $p<0,05$

Figure 19: Kaplan-Meier curve for PFS dogs with tumours with low and high PD-1 expression. The mean PFS in the group of dogs with tumours with high PD-1 expression (> 5 points) was significantly shorter than that in the group with tumours with low PD-1 expression (< 5 points). PFS-progression-free survival, PD-1-programmed cell death-1, *- $p<0.05$

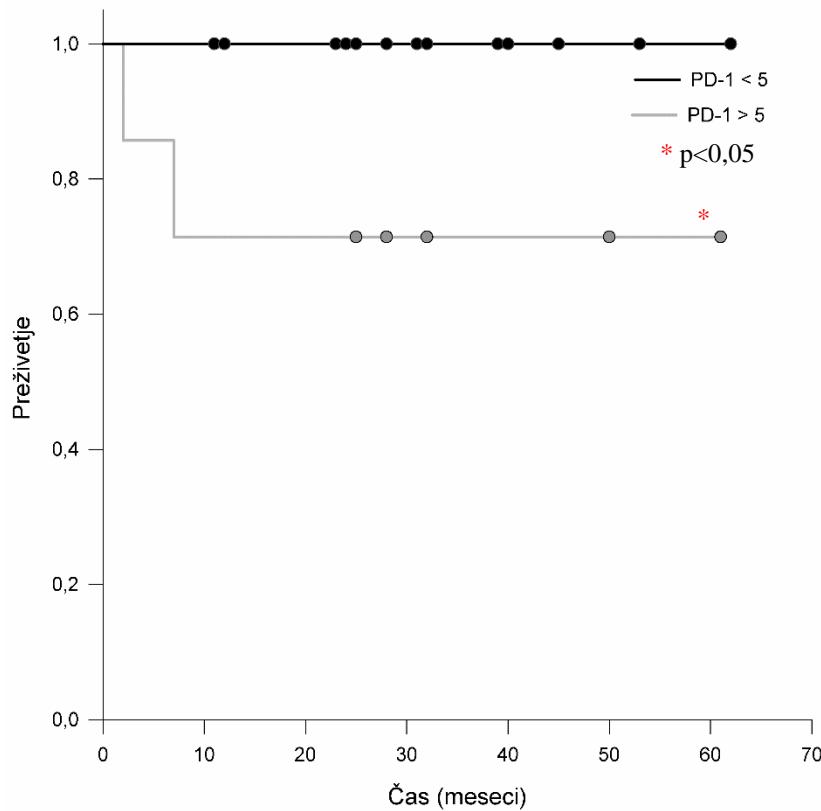
Povprečno PFS je bilo v skupini z nizkim izražanjem PD-L1 47,5 meseca, v skupini z visokim izražanjem PD-L1 pa 10,9 meseca. Slika 20 prikazuje Kaplan-Meierjevo krivuljo PFS psov s tumorji z visokim in nizkim izražanjem PD-L1.



Slika 20: Kaplan-Meierjeva krivulja PFS psov s tumorji z nizkim in visokim izražanjem PD-L1. Skupina psov s tumorji z visokim izražanjem PD-L1 (> 5 točk) je imela značilno krajše povprečno PFS kot tista s tumorji z nizkim izražanjem PD-L1 (< 5 točk). PFS-preživetje brez napredovanja bolezni, PD-L1-ligand 1 za receptor programirane celične smrti 1, *- $p<0,05$

Figure 20: Kaplan-Meier curve for PFS of dogs with tumours with low and high PD-L1 expression. The mean PFS in the group of dogs with tumours with high PD-L1 expression (> 5 points) was significantly shorter than that in the group with tumours with low PD-L1 expression (< 5 points). PFS-progression-free survival, PD-L1-programmed cell death-1 ligand 1, *- $p<0.05$

Ko smo pse razdelili v skupine glede na vrsto tumorja, pri oralnih melanomih nismo opazili razlik med izražanjem PD-1 ali PD-L1 in časom preživetja ali PFS. Pri mastocitomih smo ugotovili značilno razliko med povprečnim časom preživetja glede na izražanje PD-1. Povprečni čas preživetja je bil v skupini psov z mastocitomi z visokim izražanjem PD-1 47,5 meseca, v skupini z mastocitomi z nizkim izražanjem PD-1 pa ni bil dosežen ($p<0,05$). Slika 21 prikazuje Kaplan-Meierjevo krivuljo preživetja psov z mastocitomi z visokim in nizkim izražanjem PD-1. Razlik med skupinama psov z mastocitomi glede na izražanje PD-L1 nismo ugotovili ($p>0,05$).



Slika 21: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja psov z mastocitomi z nizkim in visokim izražanjem PD-1. Skupina psov z mastocitomi z visokim izražanjem PD-1 (> 5 točk) je imela značilno krajši povprečni čas preživetja kot tista z mastocitomi z nizkim izražanjem PD-1 (< 5 točk). PD-1-receptor programirane celične smrti 1, *- $p<0,05$

Figure 21: Kaplan-Meier survival curve of dogs with mast cell tumours with low and high PD-1 expression. The mean survival time in the group of dogs with mast cell tumours with high PD-1 expression (> 5 points) was significantly shorter than that in the group with mast cell tumours with low PD-1 expression (< 5 points), PD-1-programmed cell death-1, *- $p<0.05$

4.4 KAKOVOST ŽIVLJENJA ZDRAVLJENIH PSOV

4.4.1 Rezultati Vprašalnika o kakovosti življenja živali

V prvem delu vprašalnika so lastniki ocenjevali trditve, ki so se nanašale na različne vidike življenja njihovih psov, od 1 (se ne strinjam) do 5 (se strinjam). Rezultati so prikazani v Prilogi 11.

Večina lastnikov zdravljenih psov je duševno stanje svojih psov ocenila kot dobro, prav tako so menili, da njihovi psi po zdravljenju niso kazali znakov bolečine, po zdravljenju niso imeli zmanjšanega apetita ali vnosa vode. Lastniki pri psih niso opažali driske, bruhanja, slabosti, motenj v higieni ali pri gibanju.

Štiri dodatna vprašanja so se nanašala na oskrbo rane po zdravljenju in na stroške zdravljenja. Rezultati so pokazali, da je 33/44 (75 %) lastnikov skrbelo za rano svojega psa, medtem ko 7/44 (16 %) ni oskrbovalo rane ali je to storil drug družinski član (2/44, 4,5 %). Dva lastnika (2/44, 4,5 %) na to vprašanje nista odgovorila. Da bi bila oskrba rane lažja, so nekateri izmed lastnikov izrazili željo po dodatnem gradivu (11/44 (25 %) pisnem, 6/44 (13,6 %) slikovnem, 1/44 (2,3 %) video gradivu) ali da bi jim oskrbo rane pokazal strokovnjak (12/44, 27,3 %). Večina lastnikov (38/44, 86,4 %) bi se za zdravljenje odločila ponovno, ne glede na stroške. Tриje lastniki (3/44, 6,8 %) na vprašanje niso odgovorili.

Lastniki so ocenili, da se je splošno zdravje psov v primerjavi s tistim ob postavitvi diagnoze raka od 1 (slabše) do 5 (boljše) izboljšalo (povprečje $3,9 \pm 1,1$). Splošno HRQoL na VAS (od 1-zelo slabo do 10-odlično) so lastniki ocenili kot dobro (povprečje $7,4, \pm 2,8$).

V nadaljevanju smo trenutno HRQoL primerjali glede na preučevane skupine zdravljenih psov. Rezultati so prikazani v Tabeli 13.

Tabela 13: Ocena HRQoL v štirih preučevanih skupinah psov

Table 13: HRQoL assessment in the four studied groups

Vrsta zdravljenja	n	Povprečje	SD	Min	Max
Neinvazivno (EKT+GEP, EKT, GEP)	33	8,07	2,016	1	10
Invazivno (KRG+EKT+GEP, KRG+EKT, KRG+GEP)	11	5,11	3,723	1	10
Odgovor na zdravljenje	n	Povprečje	SD	Min	Max
Objektivni odgovor (CR, PR)	36	8,16	2,018	1	10
PD	8	3,86	3,078	1	8
Mesto tumorja	n	Povprečje	SD	Min	Max
Oralni tumorji	6	5,00	3,082	1	8
Kožni/podkožni tumorji	38	7,74	2,574	1	10
Velikost tumorja	n	Povprečje	SD	Min	Max
> 3 cm ³	17	4,92	3,252	1	10
≤ 3 cm ³	27	8,62	1,329	6	10

EKT-elektrokemoterapija; GEP-genski elektroprenos IL-12; KRG-kirurško zdravljenje; CR-popolni odgovor;

PR-delni odgovor; PD-napredovala bolezni; n-število psov; SD-standardni odklon; Min-najnižja ocena; Max-najvišja ocena

EKT-electrochemotherapy; GEP-IL-12 gene electrotransfer; KRG-surgery; CR-complete response; PR-partial response; PD-progressive disease; n-number of dogs; SD-standard deviation; Min-minimal score; Max-maximal score

V Tabeli 14 so prikazane razlike med HRQoL v preučevanih skupinah psov.

Tabela 14: Razlike v oceni HRQoL znotraj preučevanih skupin psov

Table 14: Differences in HRQoL assessment within the studied groups

Vrsta zdravljenja	M*	n**	p
Neinvazivno (EKT+GEP, EKT, GEP)	8	30	0,035
Invazivno (KRG+EKT+GEP, KRG+EKT, KRG+GEP)	5	9	
Odgovor na zdravljenje	M	n**	p
Objektivni odgovor (CR, PR)	8,5	32	0,001
PD	3	7	
Mesto tumorja	M	n**	p
Oralni tumorji	5	5	0,040
Kožni/podkožni tumorji	8	34	
Velikost tumorja	M	n**	p
> 3 cm ³	5	13	0,000
≤ 3 cm ³	9	26	

EKT-elektrokemoterapija; GEP-genski elektroprenos; KRG-kirurško zdravljenje; CR-popolni odgovor; PR-delni odgovor; PD-napredovala bolezen; M-mediana; n-število psov; *HRQoL ocena; **-5 lastnikov ni odgovorilo na vprašanje

EKT-electrochemotherapy; GEP-gene electrotransfer; KRG-surgery; CR-complete response; PR-partial response; PD-progressive disease; M-median; n-number of dogs; *HRQoL assessment; **-5 owners did not respond to the question

Rezultati so pokazali značilno razliko med vrsto zdravljenja in HRQoL psov. Lastniki so bolje ocenili HRQoL pri psih, zdravljenih z neinvazivno vrsto zdravljenja ($p<0,05$). Poleg tega so HRQoL bolje ocenili lastniki psov, ki so se odzvali na zdravljenje ($p<0,05$). HRQoL so slabše ocenili lastniki psov z oralnimi tumorji kot tistih s kožnimi/podkožnimi tumorji ($p<0,05$). Lastniki psov, ki so imeli manjše tumorje, so HRQoL ocenili bolje kot tisti, katerih psi so imeli večje tumorje ($p<0,05$).

4.4.2 Rezultati Kratkega testa o vprašalniku

Kratki test je rešilo vseh 44 lastnikov psov. Rezultati so prikazani v Prilogi 12. Večina lastnikov (29/44, 65,9 %) je ocenila, da vprašalnik popolnoma zajema problematiko, je dovolj natančen in primerne dolžine (37/44, 84,1 %). Tриje lastniki (3/44, 6,8 %), ki se niso strinjali s prvo trditvijo, so menili, da bi morali v vprašalniku upoštevati starost psov, ki pomembno vpliva na kakovost življenja. Dva lastnika (2/44, 4,5 %) sta menila, da bi morali dodati vprašanje o uspešnosti zdravljenja, dva (2/44, 4,5 %) pa, da bi bilo treba dodati vprašanje o kakovosti življenja med zdravljenjem. Velika večina lastnikov je ocenila vprašanja kot enostavna ali ponekod enostavno razumljiva (skupno 39/44, 88,7 %) in zelo ali ponekod praktična (skupno 37/44, 84,1 %).

34/44 (77,3 %) lastnikov je ocenilo, da je vprašalnik odražal kakovost življenja njihovih psov. Šest lastnikov (6/44, 13,6 %) se s trditvijo ni strinjalo: dva izmed njih (2/44, 4,5 %) sta ponovno izpostavila, da v vprašalniku nismo upoštevali starosti psov. Oba sta menila, da se je kakovost življenja njunih psov po zdravljenju sicer izboljšala, vendar sta imela psa še druge starostne težave, ki so vplivale na slabšo kakovost življenja. Dva lastnika (2/44, 4,5 %) sta menila, da bi bilo treba vprašalnik izpolnjevati pred zdravljenjem in po njem, da bi bili odgovori natančnejši.

Manj kot polovica (17/44, 38,6 %) lastnikov se je zaradi izpolnjevanja vprašalnika počutila bolj vpete v zdravljenje svojega psa. Šest lastnikov (6/44, 13,6 %), ki so odgovorili nikalno in svoj odgovor utemeljili, je zapisalo, da se počutijo vključene v zdravljenje svojih psov že od začetka in da izpolnjevanje vprašalnika tega ni bistveno spremenilo. Štirje lastniki (4/44, 9 %) niso čutili povezave med vprašalnikom in vključenostjo v zdravljenje svojih psov. Preostali lastniki (11/44, 25 %), ki so na vprašanje odgovorili nikalno, svojega odgovora niso utemeljili.

V zadnjem vprašanju smo lastnike prosili za predloge glede izboljšave vprašalnika. Dva lastnika (2/44, 4,5 %) sta menila, da bi bilo treba dodati več vprašanj odprtega tipa, ki bi bila bolj natančna. Eden izmed lastnikov (1/44, 2,3 %) je predlagal, da bi v vprašalnik dodali več vprašanj o izkušnji lastnika z zdravljenjem (npr. porabljen čas, denar).

5 RAZPRAVA

5.1 FARMAKOKINETIKA BLEOMICINA V KRVI PSOV

Eden izmed ciljev naše raziskave je bil določiti farmakokinetiko BLM v krvi psov, zdravljenih z EKT po intravenski aplikaciji BLM. Na podlagi rezultatov smo želeli preveriti, ali je časovno okno za dovajanje pulzov (8–28 minut po aplikaciji BLM) primerno in ali je treba prilagoditi odmerek BLM ali časovno okno starosti ter telesni masi psov.

Kosjekova in sod. (18) so nedavno razvili analitsko metodo (LC-MS/MS) za natančno merjenje koncentracije BLM v serumu in tkivih. V predkliničnih raziskavah so z omenjeno metodo Grošelj in sod. (103) analizirali farmakokinetiko BLM v serumu in tumorjih pri miših. Ugotovili so, da na koncentracijo BLM v tumorju najbolj vpliva ožiljenost tumorja; v karcinomih je bila koncentracija BLM 4,9-krat višja kot v melanomih. Koncentracija BLM v tumorjih ni korelirala s serumsko koncentracijo BLM pri miših.

Po naših podatkih je bila edina raziskava farmakokinetike BLM pri psih opravljena pred več kot 40 leti (105). V tej raziskavi so določali farmakokinetične lastnosti BLM v krvi petih zdravih poskusnih psov z radioimunsko analizo (RIA). Ugotovili so, da ima po intravenski aplikaciji BLM bifazno eliminacijsko krivuljo, $t_{1/2} 1,01 \pm 0,19$ h in $V_d 388 \pm 24,5$ ml/kg. V naši raziskavi je bila serumska eliminacijska krivulja BLM monofazna, $t_{1/2} 22,03 \pm 0,88$ min in $V_d 224,5 \pm 75,02$ ml/kg. Možnih vzrokov za razlike med rezultati je več. Strong in sod. (105) so v svoji raziskavi za določanje farmakokinetičnih parametrov uporabili RIA, v naši raziskavi pa smo uporabili natančnejšo metodo, LC-MS/MS. Prednosti LC-MS/MS pred RIA so višja specifičnost, senzitivnost in nižja meja detekcije (189). V našo raziskavo smo vključili 23 psov različnih starosti in telesnih mas, medtem ko so Strong in sod. preučevali farmakokinetiko BLM pri petih zdravih psih enake pasme, podobne telesne mase in starosti. V raziskavi po aplikaciji BLM tudi niso uporabili elektroporacije.

Ugotovili smo, da ima pri psih BLM majhen V_d (190), kar je skladno s hidrofilno naravo zdravila in oteženim prehajanjem BLM skozi celično membrano ter posledično manjšo sekvestracijo v celicah. Posledično ima BLM tudi kratek $t_{1/2}$ (22 minut); izračunani $t_{1/2}$ potrjuje, da je izbrano časovno okno za dovajanje električnih pulzov pri EKT ustrezno. Pri psih sicer ni

določeno, kolikšna je terapevtska koncentracija BLM za EKT, na splošno pa se pri človeku zdravila izločijo iz telesa v času $4-5 t_{1/2}$ (191). Menimo, da je izbrano časovno okno od 8 do 28 minut po aplikaciji BLM primerno, morda pa bi ga lahko, kakor pri starejših bolnikih v humani onkologiji, tudi podaljšali. Podaljšanje časa za dovajanje električnih pulzov bi bilo koristno predvsem pri zelo velikih tumorjih ali številnih metastatskih lezijah, s čimer se v praksi srečamo zelo redko.

V naši raziskavi smo ugotovili, da so imeli psi relativno majhen CL ($7,04 \pm 2,05 \text{ ml/min/kg}$); možna razloga za naša opažanja bi lahko bila akumulacija BLM v tumorskem tkivu, kamor smo dovajali električne pulze. BLM se sicer lahko kopiči tudi v pljučih in koži, kjer ga ne razgradi BLMH, zato lahko pri ljudeh BLM v teh organih povzroči neželene stranske učinke (96). Pri zdravljenih psih takih stranskih učinkov nismo opazili, za določanje vrednosti BLM v pljučih in koži pa bi bili potrebni biopsija in analiza omenjenih organov, kar je z etičnega vidika nesprejemljivo.

Glavne spremenljivke, ki lahko vplivajo na farmakokinetiko zdravila, so: starost, telesna masa, disfunkcija organov (predvsem ledvic in jeter), sočasno jemanje drugih zdravil in genetske značilnosti živali (192). Staranje lahko vpliva na farmakokinetiko zdravil, vendar pa se starostne spremembe pri osebkih ne pojavljajo enako hitro. To še posebej velja pri psih, kjer se srečamo z izrazito variabilnostjo v velikosti in obratno sorazmerno povezavo med telesno maso in pričakovano življenjsko dobo (193). V veterinarski medicini najdemo različne sisteme razvrščanja psov v starostne skupine (194–196), vendar je njihova skupna pomankljivost ta, da v starostnih skupinah ne upoštevajo telesne mase oz. velikosti psov. Zato smo v naši raziskavi povzeli sistem po Cattai in sod. (180), kjer so za namene raziskave farmakokinetike propofola razvili sistem, v katerem so pse uvrstili v dve starostni skupini in pri tem upoštevali tudi njihovo telesno maso.

Pri starejših psih lahko, podobno kot pri ljudeh, pričakujemo izgubo osnovnih funkcionalnih enot, kot so npr. nefroni v ledvicah, prav tako pa se spremeni telesna sestava, kar lahko pomembno vpliva na izločanje snovi iz organizma. S staranjem postopoma upade odstotek skupne količine vode in puste telesne mase, kar se odrazi v relativnem povišanju odstotka telesne maščobe (197). To lahko vpliva na porazdelitvene parametre vodotopnih zdravil, kot je BLM (19). Pri starejših psih se zmanjša Vd in posledično se zviša koncentracija zdravila v krvi. Zmanjšanje Vd vodotopnih zdravil pri tistih starejših psih z oslabljeno ledvično funkcijo

sovpada z zmanjšanim CL, zato se razpolovni čas izločanja bistveno ne podaljša. V naši raziskavi smo dokazali negativno korelacijo med starostjo psov in Vd, saj so imeli mlajši psi višji Vd kot starejši, razlik v CL pa v nasprotju s pričakovanji nismo ugotovili. Te ugotovitve bi lahko pripisali temu, da v skupini starejših psov ni bilo osebkov s klinično očitno oslabljeno ledvično funkcijo, ki bi lahko upočasnila izločanje BLM iz telesa. Vd je pri starejših psih torej lahko povečan zaradi relativnega povišanja odstotka telesne mašcobe, a se zdravilo ob normalni ledvični funkciji izloči iz telesa v času, primerljivem s tistim pri mlajših psih. Pri starejših psih se je sicer pokazala tudi tendenca podaljšanega $t_{1/2}$, ki pa je imela precej nizek determinacijski koeficient ($R^2=0,207$). Za potrditev ali izključitev povezanosti med starostjo psov in $t_{1/2}$ BLM bi bilo treba opraviti raziskavo na večjem številu psov.

V literaturi lahko zasledimo različne načine razvrščanja psov v skupine glede na telesno maso. Pogosto uporabljeni meja, ki loči velike in zelo velike pasme od srednjih, malih in pritlikavih, je pri 25 kg telesne mase (177, 178). Pričakovali smo, da bomo pri manjših psih zaradi hitrejše presnove ugotovili razlike v farmakokinetičnih parametrih. Pričakovana razlika je bila v našem primeru majhna, saj smo BLM odmerjali glede na telesno maso. Ne glede na to pa razlik med večjimi (> 25 kg) in manjšimi (≤ 25 kg) psi nismo ugotovili. Nekateri avtorji po vzoru iz humane medicine predlagajo, da je za farmakokinetične parametre, predvsem CL, bolj primeren izračun, prilagojen telesni površini psov (198), saj ta bolje odraža bazalno presnovo in bolj sovpada z velikostjo ledvic in s količino vode v telesu. Tudi ko smo primerjali CL glede na telesno površino, nismo opazili razlik med opazovanimi skupinama velikih in majhnih psov. Vzrok za naša opažanja je lahko v majhni variabilnosti v telesni masi psov; v prihodnosti bi bilo treba za potrditev naših opažanj razširiti vzorec in vključiti tudi zelo majhne (< 5 kg) in velike (> 50 kg) pse, kar je v kliničnih raziskavah pogosto precej težko izvesti.

BLM se po aplikaciji pri človeku v manj kot 1 % veže na plazemske beljakovine in se večinoma izloči skozi ledvice z glomerulno filtracijo (199). Pričakujemo lahko, da bo pri psih z okvarjeno ledvično funkcijo CL zdravila manjši in da se bo podaljšal $t_{1/2}$. V naši preučevani skupini je bil en pes (pacient št. 4) z blago povišano vrednostjo, preostali pa so imeli normalne vrednosti serumskega kreatinina. Crooke in sod. (200) so sicer v svoji raziskavi opazili podaljšanje $t_{1/2}$ šele pri pacientih z znatno znižanimi očistkom kreatinina. Za oceno vpliva ledvične funkcije na farmakokinetične parametre BLM bi morali v nadalnjih raziskavah vključiti pse z različno stopnjo ledvičnega popuščanja in uporabiti natančnejše diagnostične metode za oceno hitrosti

glomerulne filtracije (npr. očistek kreatinina, ioheksola ali radioaktivno označenih markerjev) (19, 201).

Nedavno so Grošelj in sod. (19) z analitsko metodo, enako naši, določali farmakokinetiko BLM v krvi starejših bolnikov (> 65 let), zdravljenih z EKT. Ugotovili so, da ima BLM po bolusni intravenski aplikaciji v odmerku $15.000 \text{ IU}/\text{m}^2$ monofazno eliminacijsko krivuljo, s čimer se skladajo tudi rezultati naše raziskave pri psih. V primerjavi z našimi rezultati so imeli bolniki daljši $t_{1/2}$ (30 minut v primerjavi z 22 minutami pri psih), kar je skladno z opažanji drugih avtorjev, da so razpolovni časi zdravil pri ljudeh daljši kot pri domačih živalih (202). Manjšo kvantitativno sposobnost presnavljanja zdravil pripisujejo daljši življenjski dobi človeka v primerjavi z živalmi. V raziskavi farmakokinetike BLM pri človeku so bili vključeni le starejši pacienti, zato primerjava parametrov pri bolnikih različnih starosti ni bila možna. V literaturi sicer zasledimo starejši raziskavi o farmakokinetiki BLM pri otrocih različnih starostnih skupin (203) in odraslih bolnikih z rakom (204). Yee in sod. (203) so ugotovili, da imajo otroci, mlajši od treh let, krajši $t_{1/2}$ in večji CL od starejših otrok (> 8 let). Pri le-teh so bili farmakokinetični parametri že primerljivi s tistimi pri odraslih ljudeh. Slednje ugotovitve bi lahko pojasnile odsotnost razlik med farmakokinetičnimi parametri v naši preučevani skupini, kjer ni bilo vključenih psov, mlajših od 5 let oziroma mladičev, pri katerih bi se morda razlike v farmakokinetiki bolj izrazito pokazale.

Z raziskavo smo potrdili, da je pri psih, zdravljenih z EKT, časovno okno za dovajanje električnih pulzov od 8 do 28 minut po intravenski aplikaciji BLM ustrezno. Glede na naše rezultate in dober klinični odgovor na zdravljenje je odmerek BLM ustrezen ter ga ni treba prilagajati starosti psov ali njihovi telesni masi.

5.2 SUBPOPULACIJE LIMFOCITOV V KRVI ZDRAVLJENIH PSOV

Eden izmed ciljev naše raziskave je bil tudi ugotavljanje dinamike sprememb v deležu limfocitov v krvi po zdravljenju s kombinacijo EKT in GEP IL-12. Posebej smo želeli ugotoviti, ali lahko z GEP IL-12 kot sistemsko imunoterapijo znižamo količino T_{reg} v krvi in ali bi lahko odstotek T_{reg} uporabili kot napovedni dejavnik za uspešnost terapije in/ali indikacijo za ponovitev zdravljenja.

Imunski pobeg tumorjev in njihovo imunosupresivno delovanje pogosto privedeta do neravnovesja v subpopulacijah imunskih celic. Številni avtorji navajajo znižane vrednosti CD8+ limfocitov v krvi psov s tumorskimi obolenji v primerjavi z zdravimi psi, prav tako pa so pri določenih vrstah tumorjev (predvsem limfomih in karcinomih) ugotovili nižji odstotek CD4+ limfocitov v krvi (23, 25, 123, 124). Med zdravljenjem s kemoterapijo so pri psih z limfomom zaznali dvig števila CD4+ in CD8+ limfocitov v krvi na normalne vrednosti, pri psih z osteosarkomom pa tega učinka med zdravljenjem niso ugotovili (23, 124). V naši raziskavi odstotkov subpopulacij limfocitov T v krvi preučevanih psov nismo primerjali z zdravimi psi. Tako kot Biller in sod. (23) tekom zdravljenja nismo opazili značilnih razlik v odstotku CD4+ in CD8+ limfocitov v krvi psov.

Zavora imunskega sistema, ki jo v tumorskem mikrookolju povzročajo T_{reg} in druge celice zaviralke, npr. mieloidne supresorske celice (MDSC, angl. myeloid-derived suppressor cells), je eden najpomembnejših mehanizmov pobega tumorjev imunskemu sistemu in ovira pri zdravljenju z imunoterapijo (30, 120). Dokazano je bilo, da se pri psih z rakavimi obolenji poviša ne le odstotek T_{reg} v tumorju, temveč tudi v krvi (22–24). Pri nekaterih vrstah tumorjev delež T_{reg} v tumorskem mikrookolju (27) ali v krvi (26, 28) korelira s kliničnim stadijem, stopnjo malignosti ali napredovanjem bolezni (26–28). V drugih raziskavah niso opazili povezave med količino T_{reg} v krvi in prognozo (23). V naši preučevani skupini psov, zdravljenih s kombinacijo EKT in GEP IL-12, se je tekom zdravljenja odstotek T_{reg} znižal ($p<0,05$), vendar pa nismo dokazali povezave med zmanjšanjem odstotka T_{reg} in odgovorom na zdravljenje. Odstotek T_{reg} je namreč značilno upadel tako v skupini pacientov s popolnim odgovorom kot pri tistih, pri katerih je bolezen napredovala kljub zdravljenju. Menimo, da znižanje odstotka T_{reg} v krvi kaže na sistemsko delovanje GEP IL-12 (125), odstotka T_{reg} pa ne moremo uporabiti kot napovedni dejavnik za uspešnost zdravljenja. Vzrokov za naše ugotovitve je lahko več. Prvi

je ta, da morda delež T_{reg} v krvi ne sovpada s tistim v tumorju in zato ne odraža dejanskega stanja v tumorskem mikrookolju. Ob pregledu literature nismo našli raziskav, s katerimi bi primerjali razmerje med T_{reg} v krvi in tumorjih pri psih. Drugi možni razlog je ta, da je morda učinek GEP IL-12 nezadosten za doseganje optimalnega odgovora in bi bilo treba zdravljenje ponavljati in/ali uporabiti višje odmerke plazmida. Tretji možni vzrok je, da tumorji uporabljajo druge načine imunskega pobega po znižanju odstotka T_{reg} v krvi (120).

Naši rezultati potrjujejo ugotovitev predklinične raziskave, da zdravljenje z IL-12 zniža koncentracijo T_{reg} (29). V raziskavi, kjer so ocenjevali prisotnost T_{reg} v tumorskem tkivu pri miših po zdravljenju z GEP IL-12, se je število T_{reg} začasno sicer znižalo, a se je nato do 4-kratno povišalo od 3 do 10 dni po zdravljenju (136). Prav tako so pri psih z mastocitomi, zdravljenimi s peritumorskim GEP IL-12, ugotovili značilno povišanje deleža T_{reg} v tumorju 4 tedne po zdravljenju (14). Nenadno reinfiltracijo s T_{reg} bi lahko pripisali vnetnim dejavnikom, kratkotrajnemu vplivu IL-12 na zmanjšanje deleža T_{reg} ali prekratkemu intervalu vzorčenja tkiva po zdravljenju (14, 136). Tudi v naši raziskavi se je pri 8/29 (27,6 %) psih 4 tedne po zdravljenju povišal odstotek T_{reg} , vendar je pri 7/8 (87,5%) pacientov upadel ob koncu opazovalnega obdobja, pri enem psu pa je ostal nespremenjen. Menimo, da je nenadno povišanje deleža T_{reg} po zdravljenju z GEP IL-12 tako v predkliničnih kot v naši raziskavi lahko posledica vnetnih dejavnikov zaradi imunskega odziva na zdravljenje (14).

Poleg odstotka T_{reg} se v humani (132–135, 205) in veterinarski literaturi (23) kot prognostični dejavnik uporablja razmerje CD8+/ T_{reg} v krvi ter tumorjih. Pacienti z nižjim razmerjem CD8+/ T_{reg} so imeli v navedenih raziskavah slabšo prognozo. V naši raziskavi smo zaznali značilno razliko v razmerju CD8+/ T_{reg} tekom zdravljenja (ob koncu opazovalnega obdobja v primerjavi s časom pred zdravljenjem), vendar nismo ugotovili povezave med razmerjem CD8+/ T_{reg} in odgovorom na zdravljenje. Razmerje se je namreč značilno povišalo tako v skupini psov z objektivnim odgovorom na zdravljenje (CR in PR) kot pri tistih psih, pri katerih je bolezen napredovala kljub zdravljenju (PD). Vzrok je lahko v heterogenosti izbranih tumorjev: v prej omenjenih raziskavah so v veterinarski medicini odkrili povezavo le pri osteosarkomih, pri človeku pa se kot prognostični dejavnik uporablja predvsem pri karcinomih (132–135). V naši preučevani skupini ni bilo vključenih psov s sarkomi ali karcinomi, temveč z drugimi vrstami tumorjev (oralni melanom, mastocitom in kožni plazmacitom). Možno je, da za vrste tumorjev, ki smo jih preučevali v raziskavi, razmerje CD8+/ T_{reg} ni ustrezni prognostični dejavnik. Za potrditev te hipoteze bi bilo treba preučevano skupino razširiti in vanjo dodati pse

s karcinomi in sarkomi, zdravljenimi z GEP IL-12 in EKT. Rezultati raziskave kažejo, da zdravljenje s kombinacijo EKT in GEP IL-12 zniža odstotek T_{reg} in poviša razmerje CD8+/ T_{reg} v krvi psov z različnimi vrstami tumorjev. Zdravljenje ne vpliva na odstotek CD4+ in CD8+ limfocitov v krvi. Znižanje odstotka T_{reg} ni povezano z odgovorom na zdravljenje, zato ni uporabno kot napovedni dejavnik ali kot vodilo za odločitev o ponavljanju zdravljenja. GEP IL-12 bi v prihodnosti lahko kombinirali z drugimi vrstami zdravljenj, npr. s protitelesi proti PD-1 in PD-L1, in tako še povečali njegov sistemski protitumorski učinek.

5.3 IZRAŽANJE RECEPTORJEV IN LIGANDOV PROGRAMIRANE CELIČNE SMRTI 1 V TUMORJIH

V naši raziskavi smo želeli z imunohistokemijo ovrednotiti izražanje PD-1 in PD-L1 v tumorjih 30 psov, zdravljenih s kombinacijo EKT ter GEP IL-12, in ugotoviti, ali izražanje katerega koli od antigenov vpliva na izid zdravljenja ter čas preživetja psov.

Izražanje PD-1 in PD-L1 v tumorskem mikrookolju je eden izmed načinov tumorskega pobega imunskega sistema. Pri človeku je izražanje PD-L1 povezano s slabšo prognozo, hitrejšim napredovanjem bolezni in krajšo dobo preživetja bolnikov (33–38). Izražanje PD-1 v mastocitomih pri psih je bilo doslej ovrednoteno v dveh raziskavah, in sicer s pretočno citometrijo (41) in imunohistokemijo (206). Izražanje je bilo ugotovljeno v 50–54,2 % tumorjev (41, 206). Izražanje PD-L1 v mastocitomih pa je bilo ovrednoteno v štirih raziskavah: v treh raziskavah (32, 41, 206) z imunohistokemijo in v eni (40) s pretočno citometrijo. Izražanje PD-L1 so ugotovili v 35,7–84,6 % mastocitomov. V naši raziskavi smo ugotovili izražanje PD-1 v 95,2 % mastocitomov, PD-L1 pa so izražali vsi mastocitomi. Razlika v rezultatih izražanja bi bila lahko posledica uporabe različnih metod (protočna citometrija v primerjavi z imunohistokemijo), stopnji malignosti tumorjev ter različnih primarnih protiteles in različnih načinov ocenjevanja imunohistokemičnega obarvanja. Maekawa in sod. (32, 40) so v obeh raziskavah preučevali izražanje PD-L1 v mastocitomih najvišje histološke stopnje malignosti (III) po Patnaiku (183), medtem ko so bili naši vzorci tumorjev vseh treh stopnij malignosti. Žagar (206) sicer opisuje višje izražanje PD-L1 pri mastocitomih stopnje malignosti II in III po Patnaiku, pri naših vzorcih povezave med stopnjo malignosti in izražanjem PD-1 in PD-L1 nismo mogli statistično ovrednotiti, ker je bilo vključeno premajhno število psov s tumorji stopnji malignosti I in III. Poleg razlik v preiskovanih tumorjih so bila v raziskavah uporabljena različna primarna protitelesa in različni načini ocenjevanja. Medtem ko smo v naši raziskavi uporabili kvantitativni sistem ocenjevanja, pri katerem smo upoštevali jakost obarvanja in delež obarvanih celic, so v drugih raziskavah uporabili binarni sistem, kjer so tumorje uvrstili v skupini z ali brez izražanja PD-L1. Meja med skupinama je bila 0 % (32, 206) ali 10 % (41), v naši raziskavi pa smo postavili mejo pri 5 %-u deležu obarvanih celic. Za potrebe naše raziskave smo želeli čim bolj objektivno ovrednotiti izražanje PD-1 in PD-L1, zato smo izbrali metodo ocenjevanja po Sampedro-Núñezu in sod. (187), s katero smo lahko bolje kvantificirali rezultate in jih primerjali med seboj. Mejo med visokim izražanjem smo določili glede na mediano

izražanja PD-1 in PD-L1 v združenem vzorcu. Menimo, da bi bilo treba v prihodnosti za lažjo primerjavo med raziskavami poenotiti sistem ocenjevanja imunohistokemičnega barvanja.

Tudi pri vzorcih človeških tumorjev se rezultati imunohistokemičnega barvanja PD-L1 med raziskavami zelo razlikujejo (207). Možnih vzrokov, ki lahko privedejo do nasprotujučih si rezultatov med posameznimi raziskavami, je več. Prvi je uporaba različnih protiteles z nedokazano medsebojno primerljivostjo (207). Drugi je uporaba različnih definicij pozitivne reakcije (obarvanje na površini celic v primerjavi s citoplazemskim obarvanjem, obarvanje tumorskih celic in drugic celic tumorskega mikrookolja in različne meje med pozitivnim ter negativnim izražanjem PD1/PD-L1) (187, 207). Tretji vzrok, na katerega opozarjajo Patel in sod. (207), so različni načini odvzema tkiv (incizijska ali ekszisijska biopsija in primarni tumor ali metastatska lezija) ter različna priprava in obdelava vzorcev. Prav tako je obarvanje lahko različno, če je izražanje PD-L1 spodbujeno z vnetnimi citokini (IFN- γ) ali onkogeni. Vse našteto so dejavniki, ki jih je v svetovnem merilu sicer nemogoče popolnoma poenotiti, pa vendar bi oblikovanje splošnih priporočil omogočilo bolj primerljive rezultate in hitrejši napredek na področju raziskav imunskeh kontrolnih točk in njihovih zaviralcev.

Znano je, da ima oralni melanom pri psih tako kot melanom pri človeku visoko izražanje PD-L1. Maekawa in sod. so z imunohistokemičnim barvanjem ugotovili izražanje PD-L1 v 8 (40) in 40 (32) oralnih melanomih pri psih. Izražanje je bilo v obeh primerih visoko – 100 % v prvi in 90 % v drugi raziskavi – kar je skladno z našimi rezultati, kjer je PD-L1 izražalo 100 % oralnih melanomov. S pretočno citometrijo so v drugi raziskavi ugotavljeni tudi izražanje PD-1 na limfocitih v tumorjih; ugotovili so visoko izražanje na CD4+ (80,2–96,8 %) in CD8+ (70,9–96,6 %) limfocitih. Izražanje je bilo višje kot na limfocitih zdravih psov, izoliranih iz krvi. Po naših podatkih ni objavljenih raziskav, kjer bi z imunohistokemijo določali izražanje PD-1 v vzorcih pasjega oralnega melanoma. V naši raziskavi je PD-1 izražalo 100 % tumorjev.

Pomen izražanja PD-1 in PD-L1 kot prognostičnega dejavnika v humani medicini še ni popolnoma razjasnjen. V nekaterih raziskavah je bilo visoko izražanje PD-L1 povezano s slabšo prognozo pri različnih vrstah tumorjev (33–38), drugi avtorji pa navajajo, da je visoko izražanje PD-1 (140) ali PD-L1 (140–142) povezano z ugodnejšo prognozo. Avtorji slednjih raziskav predpostavljajo, da je višje izražanje PD-L1 povezano z aktivnejšim imunskega odziva v tumorju, saj so ugotovili višji odstotek tumor infiltrirajočih limfocitov v preiskovanih vzorcih (141). Edina raziskava v veterinarski medicini, kjer so doslej ovrednotili izražanje PD-1 in PD-

L1 v povezavi s preživetjem psov, je bila opravljena pri večjem številu mastocitomov različnih stopenj malignosti (206). Medtem ko izražanje PD-L1 ni vplivalo na preživetje psov, so ugotovili, da so imeli psi s tumorji brez izražanja PD-1 slabšo prognozo kot tisti, katerih tumorji so izražali PD-1. V naši raziskavi je bilo visoko izražanje (skupno število točk ≥ 5) tako PD-1 kot PD-L1 povezano z napredovanjem bolezni, s krajšim časom preživetja in PFS. Vseh deset psov, tako z mastocitomi kot oralnimi melanomi, ki na zdravljenje niso odgovorili (PD), je bilo uvrščenih v skupino z visokim izražanjem PD-L1, medtem ko je bilo 8/10 (80 %) teh psov uvrščenih v skupino z visokim izražanjem PD-1. Prav tako je bilo v skupino s tumorji z visokim izražanjem PD-L1 uvrščenih vseh šest psov, ki so poginili ali bili evtanazirani zaradi vzrokov, povezanih s tumorjem. 5/6 (83 %) teh psov je bilo uvrščenih v skupino z visokim izražanjem PD-1. Združeni rezultati kažejo, da bi nam lahko morda določanje izražanja PD-1 in PD-L1 pomagalo pri napovedovanju odgovora na zdravljenje z EKT in GEP IL-12, preživetja ter verjetnosti ponovitve bolezni.

Pse smo razdelili tudi v skupine glede na vrsto tumorja (21 psov z mastocitomi in 9 z oralnimi melanomi), ker smo želeli preveriti, ali obstajajo razlike tudi med skupinami psov znotraj posameznih tipov tumorjev. Pri psih z oralnimi melanomi nismo zaznali značilnih razlik v času preživetja ali PFS. Vzrok za to bi lahko bilo premajhno število vključenih psov s takimi tumorji. Vsi psi z oralnimi melanomi so bili uvrščeni v skupino z visokim izražanjem PD-L1. Ne vemo še, ali lahko to ugotovitev posplošimo na vse oralne melanome, zato bo v prihodnosti treba oceniti izražanje na večjem številu vzorcev. 3/9 (33,3 %) psov z oralnim melanomom pa je bilo uvrščenih v skupino z nizkim izražanjem PD-1. Vzorec je bil sicer še vedno premajhen za statistično analizo, vendar pa je zanimivo opažanje, da je imel pacient z najnižjim izražanjem PD-1 (skupno število točk 1, pacient št. 28) v skupini oralnih melanomov najdaljše preživetje (22 mesecev) in je bil kljub napredovanju bolezni (zasevki v pljučih) evtanaziran zaradi razlogov, nepovezanih s tumorjem. V skupini psov z mastocitomi smo ugotovili značilno razliko v povprečnem času preživetja glede na izražanje PD-1. V nasprotju z dosedanjimi ugotovitvami (206) so imeli psi s tumorji z visokim izražanjem PD-1 krajši čas preživetja kot tisti s tumorji z nizkim izražanjem PD-1.

Pri človeku protitelesa proti PD-1 in PD-L1 že uporabljajo za zdravljenje neresekabilnega ali metastatskega melanoma, nedrobnoceličnega raka pljuč, Hodgkinsovega limfoma in karcinoma pljuč (208). Kljub temu da so v več predkliničnih raziskavah razvili protitelesa proti pasjima

PD-1 in PD-L1 (39, 139, 151, 209), po naših podatkih obstaja le ena klinična raziskava o njihovi uporabnosti pri zdravljenju psov s tumorji. Maekawa in sod. (152) so razvili lastno protitelo proti PD-L1 in ga uporabili pri zdravljenju manjše skupine psov z metastatskim oralnim melanomom in nediferenciranim sarkomom. Čeprav se je zdravljenje izkazalo za varno in učinkovito, po naših podatkih podobnega pristopa za zdravljenje večjega števila psov še niso raziskali. Glede na rezultate naše raziskave menimo, da bi bila lahko pri pacientih s tumorji z visokim izražanjem PD-1 ali PD-L1 kombinacija zdravljenja z blokiranjem omenjenih molekul in EKT ter GEP IL-12 učinkovita pri zdravljenju mastocitomov in oralnih melanomov pri psih.

Rezultati kažejo, da je pri psih visoko izražanje PD-1 in PD-L1 v tumorjih povezano s krajsim časom preživetja, krajsim PFS ter pogostejšim napredovanjem bolezni po zdravljenju z EKT in GEP IL-12. Glede na naše ugotovitve menimo, da bi izražanje PD-1 in PD-L1 morda lahko uporabili kot napovedni dejavnik, prav tako pa bi v prihodnosti lahko kombinirali uporabo EKT in GEP IL-12 s protitelesi proti PD-1 ali PD-L1.

5.4 KAKOVOST ŽIVLJENJA ZDRAVLJENIH PSOV

Vprašalniki za ocenjevanje HRQoL so pomembno orodje za vrednotenje vpliva raka in onkoloških zdravljenj na delovanje telesa ter počutje posameznika. Njihova uporaba v veterinarski medicini postaja vedno bolj pomembna, saj nam lahko pomagajo pri odločitvah o zdravljenju, zagotavljajo prognostične podatke, z njimi ocenujemo vpliv novih vrst zdravljenj, prav tako izboljšujejo vez med veterinarjem in lastnikom, saj se slednji tako počutijo bolj vključene v postopek zdravljenja bolezni.

Po zdravljenju z EKT in/ali GEP IL-12 je pričakovana posledica nekroza tumorja in spremljajoči klinični znaki, kot so edem, eritem ter druge značilnosti lokalnega vnetja, ki lahko trajajo do 14 dni po zdravljenju. Po tem obdobju se na mestu zdravljenja pojavi krasta, ki odpade približno mesec dni po zdravljenju (16). To je najprimernejši čas za oceno odgovora na zdravljenje po kriterijih RECIST (182) in razlog, da smo vprašalnike o kakovosti življenja lastnikom razdelili vsaj en mesec po zdravljenju, ko so njihovi psi že prestali vse faze celjenja zdravljenega področja. Menimo tudi, da so lastniki po zaključku zdravljenja HRQoL svojih psov lahko ocenili bolj objektivno kot med obdobjem nekroze tumorja in celjenja rane.

Odgovor na zdravljenje pomembno vpliva ne le na zdravljeni žival, temveč tudi na lastnikovo oceno HRQoL. Razumljivo je, da bodo lastniki živali, ki na zdravljenje ne odgovarjajo po pričakovanjih, presodili, da je kakovost življenja živali enaka ali celo slabša kot pred zdravljenjem, tudi če veterinar oceni drugače. Navedeno je lahko odraz razočaranja lastnika nad spodeljelim zdravljenjem raka, kar lastnik pogosto še posebej težko sprejme. Dokazano je, da lastniki živali, ki se na zdravljenje raka slabo odzovejo, ocenjujejo HRQoL svojih živali slabše kot tisti, katerih živali se na zdravljenje dobro odzovejo (172, 176). To smo potrdili tudi v naši raziskavi, kjer smo ugotovili značilno razliko v oceni HRQoL med skupinama psov z objektivnim odgovorom na zdravljenje in tistih, pri katerih je bolezen napredovala kljub zdravljenju.

Medtem ko kožni in podkožni tumorji pri psih na EKT in/ali GEP IL-12 odgovarjajo celo do 100 % (8, 74, 77, 88), je uspeh pri zdravljenju oralnih tumorjev še vedno skromen, in sicer 11–50 %, odvisno od vrste tumorja (12, 13, 15, 176). Zato smo pse uvrstili v skupino z oralnimi tumorji (oralni melanom in fibrosarkom) ter primerjali oceno HRQoL z drugimi psi, pri katerih smo zdravili kožne in podkožne tumorje različnih tipov. Pričakovano so lastniki psov z oralnimi

tumorji HRQoL svojih psov ocenili značilno slabše kot tisti, katerih psi so imeli kožne in podkožne tumorje. Tellado in sod. (176), ki so ocenjevali HRQoL pri večjem številu psov z oralnim melanomom, zdravljenih z EKT, so ugotovili, da je slabša ocena HRQoL sovpadala z višjim kliničnim stadijem bolezni, ki je pogojen tudi s slabšim odgovorom na zdravljenje, kar smo potrdili tudi v naši raziskavi.

Zdravljene pse smo razdelili tudi v skupini glede na vrsto zdravljenja; v skupino invazivnega zdravljenja smo vključili tiste, pri katerih je bilo EKT in/ali GEP IL-12 dodano kirurško zdravljenje, v skupino neinvazivnega zdravljenja pa smo uvrstili tiste, pri katerih je bila izvedena samo EKT in/ali GEP IL-12. Ugotovili smo, da so lastniki psov, zdravljenih z neinvazivno vrsto zdravljenja, ocenili HRQoL svojih psov značilno boljše kot lastniki, katerih pse smo zdravili z invazivno vrsto zdravljenja. Rezultat bi lahko pojasnili s tem, da je postopek celjenja pri ranah, kjer EKT in/ali GEP IL-12 kombiniramo s kirurškim posegom, pogosto daljši. To lahko pomeni večje breme za lastnika in vpliva na vsakdanje življenje psa in lastnika bistveno dlje kot v primerih, kjer kirurgija ni vključena v protokol zdravljenja. Nekateri lastniki menijo, da je HRQoL pri takih psih slabša, saj so pogosto potrebni pogostejši obiski pri veterinarju, kar je za nekatere pse velik stres. Pomemben delež psov v skupini z invazivnim zdravljenjem so bili psi z oralnimi tumorji. Slabša ocena HRQoL v skupini z invazivnim zdravljenjem bi bila lahko torej povezana tudi s slabšim odgovorom na zdravljenje in ne s kirurškim posegom. Da bi razlikovali, ali ima na HRQoL večji vpliv vrsta tumorja ali način zdravljenja, bi bilo treba v raziskavo vključiti večje število psov s kožnimi in podkožnimi tumorji, zdravljenimi z invazivno vrsto zdravljenja.

Velikost tumorja je sorazmerna s pričakovanim obsegom nekroze tumorja po zdravljenju z EKT in GEP IL-12. Večji tumorji so lahko torej večje breme za lastnika, ker se obdobje okrevanja podaljša, oskrbi rane pa je treba nameniti več pozornosti. Prav tako je pri večjih tumorjih pogosto potrebna uporaba nesteroidnih protivnetnih zdravil (3–5 dni), kar lahko vpliva na oceno HRQoL zdravljenih psov. Zato smo primerjali oceno HRQoL živali z manjšimi (prostornina tumorja $\leq 3 \text{ cm}^3$) in večjimi (prostornina tumorja $> 3 \text{ cm}^3$) tumorji. Rezultati kažejo, da so lastniki psov z manjšimi tumorji ocenili HRQoL bolje kot tisti, katerih psi so imeli večje tumorje.

Z vprašalnikom smo ugotovili, da je večina lastnikov aktivno sodelovala pri zdravljenju svojih psov, saj jih je 80 % redno oskrbovalo rane. Nekateri lastniki so izrazili željo po dodatnem

gradivu o oskrbi rane (25 % po pisnem, 13,6 % po slikovnem, 2,3 % po video gradivu) ali da bi jim oskrbo rane pokazal strokovnjak (27,3 %). Podatke bomo uporabili kot vodilo za nadaljnje izobraževanje lastnikov, da bi izpolnili njihova pričakovanja glede rezultatov zdravljenja in da bi izboljšali komunikacijo med lastnikom ter veterinarjem.

S kratkim testom smo ugotovili, da je bila večina lastnikov zadovoljna z vsebino, dolžino, razumljivostjo in s praktičnostjo vprašalnika. Prav tako jih je večina (85 %) menila, da je vprašalnik omogočil ustrezno oceno kakovosti življenja njihovih psov. Rezultat je primerljiv s tistim, kakršnega so v svoji raziskavi ugotovili Lynch in sod. (42); v njihovi raziskavi je 98 % lastnikov menilo, da vprašalnik odraža kakovost življenja njihovih živali. Dva lastnika sta menila, da HRQoL ne moreta ovrednotiti zaradi sočasnih starostnih zdravstvenih težav svojih psov, sta pa ocenila, da se je kakovost življenja njunih psov po zdravljenju izboljšala. Dva izmed lastnikov sta menila, da bi bilo treba vprašalnike izpolniti dvakrat, in sicer pred zdravljenjem in po njem. S pripombo se strinjam, saj bi se tako v prihodnosti izognili subjektivnosti glede HRQoL pred zdravljenjem in bi lahko še bolj natančno ovrednotili kakovost življenja zdravljenih psov. Večina lastnikov se po izpolnjevanju vprašalnika ni počutila bolj vpetih v zdravljenje svojih psov, vendar so tisti, ki so odgovor utemeljili, menili, da so se počutili vključene v zdravljenje svojih psov že od začetka in da izpolnjevanje vprašalnika tega ni bistveno spremenilo.

Ocenujemo, da ima raziskava HRQoL tri večje omejitve. S prvo se srečujemo pri vseh instrumentih za merjenje kakovosti življenja pri živalih, saj je poročevalec druga oseba, tj. lastnik živali. Njegova ocena ne odraža nujno resnične HRQoL živali, prav tako lahko nanjo vpliva več dejavnikov, npr. osebnostne lastnosti lastnika ali odgovor na zdravljenje. Druga omejitev je, da so živali z rakavimi obolenji praviloma starejše in so pri njih pogoste sočasne druge bolezni, ki lahko vplivajo na njihovo HRQoL. V takih primerih lastnik pogosto težko loči med vplivom tumorja, onkološkega zdravljenja ali sočasne druge bolezni na kakovost življenja živali. Tretja omejitev je, da je bil osnovni vprašalnik zasnovan tako za pse kot za mačke, ki se zelo različno obnašajo in različno izražajo kakovost življenja. V prihodnosti bo treba oblikovati ločene vprašalnike za pse in mačke, da bomo tako dobili natančnejše rezultate.

Rezultati naše raziskave so v skladu z rezultati iz humane onkologije, kjer avtorji navajajo znatno izboljšanje HRQoL pri bolnikih, zdravljenih z EKT (61). V omenjeni raziskavi je bilo z rezultati zdravljenja zadovoljnih 80 % pacientov, kar je primerljivo z našimi ugotovitvemi, da

je 86 % lastnikov tako zadovoljnih z zdravljenjem, da bi se zanj ponovno odločili, ne glede na stroške. Poleg tega ima vprašalnik široko uporabno vrednost ne le za živali, ki so zdravljene z metodami na podlagi elektroporacije, temveč tudi za živali, ki so zdravljene z drugimi vrstami onkoloških zdravljenj (42). To je prvi vprašalnik o HRQoL v slovenskem veterinarskem prostoru in pomembno izhodišče za oceno HRQoL pri psih in mačkah z različnimi obolenji.

6 ZAKLJUČKI

- Telesna masa in starost psov ne vplivata na farmakokinetične parametre bleomicina v krvi psov, zdravljenih z elektrokemoterapijo. Izbrano časovno okno za dovajanje električnih pulzov (8–28 minut) po aplikaciji bleomicina je primerno.
- Kombinacija elektrokemoterapije in genskega elektroprenosa plazmidne DNA z zapisom za pasji IL-12 ne vpliva na odstotek CD4+ ter CD8+ limfocitov, zmanjša pa odstotek regulatornih limfocitov T in poviša razmerje med CD8+ ter regulatornimi limfociti T v krvi zdravljenih psov. Ugotovljene spremembe v subpopulacijah limfocitov ne sovpadajo s kliničnim odgovorom na zdravljenje.
- Psi s tumorji z visokim izražanjem PD-1 in PD-L1 na kombinirano zdravljenje z elektrokemoterapijo in genskim elektroprenosom plazmidne DNA z zapisom za pasji IL-12 odgovarjajo slabše, imajo krajsi čas preživetja ter preživetje brez napredovanja bolezni kot psi s tumorji z nizkim izražanjem PD-1 in PD-L1.
- Lastniki ocenjujejo kakovost življenja svojih psov po zdravljenju z elektrokemoterapijo in/ali genskim elektroprenosom plazmidne DNA z zapisom za pasji IL-12 kot dobro ter bi zdravljenje večinoma ponovno izbrali. Lastniki kakovost življenja svojih psov ocenjujejo slabše pri psih z večjimi tumorji, oralnimi tumorji in ko elektrokemoterapijo in/ali genski elektroprenos plazmidne DNA z zapisom za pasji IL-12 kombiniramo z invazivnim kirurškim zdravljenjem.

7 POVZETEK

Elektroporacija je fizikalna metoda, ki omogoča ali izboljša vnos molekul v celice. Izpostavitev tkiv kratkim visokonapetostnim električnim pulzom povzroči nastanek začasnih por v membranah celic in omogoči prehod želenih snovi v citosol. Elektrokemoterapija (EKT) je lokalna metoda za zdravljenje tumorjev, pri kateri intravensko ali intratumorsko apliciramo kemoterapevtike (bleomicin (BLM) ali cisplatin) in nato izpostavimo tumor električnim pulzom. Membrane tumorskih celic postanejo prepustnejše za kemoterapevtike, ki sicer slabo prehajajo v notranjost celic. Tako dosežemo visoko znotrajcelično koncentracijo zdravila in posledično bolj učinkovito protitumorsko delovanje, obenem pa zmanjšamo sistemsko toksičnost, ker so za uspešno zdravljenje potrebni nizki odmerki kemoterapevtikov. Poleg EKT se elektroporacija uporablja tudi za genski elektroprenos (GEP), kjer v tkivo injiciramo plazmidno DNA z zapisom za terapevtski gen, tkivo pa nato izpostavimo električnim pulzom. Ena izmed najbolj raziskanih je imunska terapija z interlevkinom-12 (IL-12), ki deluje protitumorsko na več načinov: ima antiangiogen učinek, aktivira citotoksične limfocite T in makrofage M1.

Tema doktorske disertacije je bila vrednotenje postopkov EKT in GEP IL-12 pri zdravljenju spontanih oralnih in kožnih tumorjev pri psih. Namen raziskav je bil izboljšanje učinkovitosti zdravljenja, izbira primernih pacientov in napovedovanje odgovora na kombinirano zdravljenje.

V prvem sklopu raziskave smo določali farmakokinetiko BLM v krvi pri 23 psih, zdravljenih z GEP IL-12 in EKT po intravenski aplikaciji BLM. Koncentracijo BLM v serumu smo kvantitativno določili s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Po izračunu farmakokinetičnih parametrov smo ugotovili, da ima BLM pri psih monofazno serumsko eliminacijsko krivuljo, majhen porazdelitveni volumen (V_d ; 224,5 ml/kg), majhen očistek (CL ; 7,04 ml/min/kg) in kratek razpolovni čas ($t_{1/2}$; 22,03 min). Telesna masa psov ni vplivala na farmakokinetiko BLM. Starejši psi so imeli nižji V_d , na druge farmakokinetične parametre pa starost ni vplivala.

V drugem delu raziskave smo določali subpopulacije limfocitov v krvi psov, zdravljenih s kombinacijo EKT in GEP IL-12. Vključili smo 29 psov z različnimi vrstami tumorjev in določali subpopulacije limfocitov (CD4+, CD8+, T_{reg}) s pretočno citometrijo v različnih

časovnih obdobijh (pred zdravljenjem, 4 tedne po zdravljenju in ob koncu opazovalnega obdobja). Tekom zdravljenja nismo ugotovili značilnih razlik v odstotku CD4+ in CD8+ limfocitov. Ob koncu opazovalnega obdobja je značilno upadel odstotek T_{reg} in se je povišalo razmerje CD8+/T_{reg} v krvi zdravljenih psov; spremembe niso sovpadale z odgovorom na zdravljenje.

Treći del doktorske raziskave je obsegal določanje izražanja receptorjev in ligandov programirane celične smrti 1 (PD-1 in PD-L1) v tumorjih 30 psov, zdravljenih s kombinacijo EKT in GEP IL-12. Vključili smo 21 psov z mastocitomi in 9 z oralnimi melanomi. Izražanje PD-1 in PD-L1 smo določali z imunohistokemičnim barvanjem. Uporabili smo primarna kunčja poliklonska protitelesa proti človeškemu PD-1 in PD-L1. Skupni rezultat, t.i. izražanje PD-1 in PD-L1, smo pridobili s seštevkom ocene jakosti obarvanja in deleža obarvanih celic (od 0 do 7). PD-1 je izražalo 20/21 (95,2 %) mastocitomov in 9/9 (100 %) oralnih melanomov, PD-L1 pa so izražali vsi tumorji. Mediana izražanja PD-1 je bila 4,75, PD-L1 pa 5,2. Glede na mediano izražanja smo določili mejo med visokim (> 5) in nizkim (≤ 5) izražanjem PD-1 in PD-L1. Mastocitomi so izražali manj PD-1 in PD-L1 kot oralni melanomi, razlike v izražanju PD-1 in PD-L1 med vrstama tumorjev niso bile značilne. Psi s tumorji z višjim izražanjem PD-1 in PD-L1 so imeli krajsi povprečni čas preživetja in krajše preživetje brez napredovanja bolezni (PFS) kot tisti s tumorji z nizkim izražanjem PD-1 in PD-L1. Prav tako so imeli psi s tumorji z visokim izražanjem PD-1 in PD-L1 slabši odgovor na zdravljenje, saj je pri njih bolezen pogosteje napredovala kot pri tistih s tumorji z nizkim izražanjem PD-1 in PD-L1.

V zadnjem delu raziskave smo lastnikom psov, zdravljenih z EKT in/ali GEP IL-12, razdelili Vprašalnike o kakovosti življenja psov in Kratke teste za ocenjevanje vprašalnika, da bi ovrednotili z zdravjem povezano kakovost življenja (HRQoL) psov. Lastniki so ocenili, da se je HRQoL psov po zdravljenju izboljšala. Lastniki so HRQoL svojih psov ocenili slabše pri psih z večjimi tumorji, oralnimi tumorji in ko smo EKT in/ali GEP IL-12 kombinirali z invazivnim kirurškim zdravljenjem. Večina lastnikov je ocenila, da vprašalnik popolnoma zajema problematiko in odraža kakovost življenja njihovih psov.

Rezultati doktorske naloge bodo pomagali pri nadalnjem zdravljenju psov, pripravi protokolov in napovedovanju odgovora na zdravljenje z EKT in/ali GEP IL-12. Prav tako bo izražanje PD-1 in PD-L1 morda uporabno kot napovedni dejavnik za odgovor na kombinirano zdravljenje pri translaciiji v raziskave v humani onkologiji. Rezultati doktorskih raziskav bodo primerni tudi

kot izhodišče za morebitne nove kombinacije GEP IL-12 z drugimi zdravili, npr. zaviralci imunskih kontrolnih točk.

8 SUMMARY

Electroporation is a physical method that enables or improves the uptake of molecules into cells. Exposure of tissues to short, high-voltage electrical pulses causes the formation of temporary pores in the cell membranes and enables the entry of the desired substances into the cytosol. Electrochemotherapy (ECT) is a local method for treating cancer, which consists of the intravenous or intratumoural delivery of chemotherapeutic drugs (bleomycin (BLM) or cisplatin) followed by exposure of the tumour to electrical pulses. The membranes of the tumour cells become more permeable to chemotherapeutic drugs, which otherwise pass poorly through the cell membrane. A high intracellular concentration of the drug and thus, more efficient antitumour activity is achieved, while reducing systemic toxicity. Apart from ECT, electroporation can also be employed for gene electrotransfer (GET), where plasmid encoding a therapeutic gene is injected into the tissue followed by exposure of the tissue to electrical pulses. One of the most promising treatments is immune therapy with interleukin-12 (IL-12), which has several antitumour properties: it has an antiangiogenic effect and activates cytotoxic T lymphocytes and M1 macrophages.

The topic of this doctoral dissertation was to evaluate the procedures of ECT and IL-12 GET in the treatment of spontaneous oral and cutaneous tumours in dogs. The aim of the research was to improve the treatment efficacy, enable the selection of suitable patients and improve the prediction of the response to the combined treatment.

In the first part of the research, we determined the pharmacokinetics of BLM in the blood of 23 dogs, treated with IL-12 GET and ECT with intravenous application of BLM. The concentration of BLM in the serum was determined by liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (LC-MS/MS). After calculating the selected pharmacokinetic parameters, we found that BLM in dogs has a monophasic elimination curve, low volume of distribution (V_d ; 224.5 ml/kg), low clearance (CL; 7.04 ml/min/kg) and short elimination half-time ($t_{1/2}$; 22.03 min). The body weight of the dogs did not have an effect on pharmacokinetic parameters. Older dogs had a lower V_d ; however, the age of the dogs did not have an effect on other pharmacokinetic parameters.

In the second part of the research, we evaluated the lymphocyte subpopulations in the blood of dogs treated with ECT and IL-12 GET. We included 29 dogs with different tumours and

determined the lymphocyte subpopulations (CD4+, CD8+, T_{reg}) by flow cytometry at different time points (before treatment, 4 weeks after treatment and at the end of the observation period). No significant differences in CD4+ and CD8+ lymphocyte counts were observed during treatment. At the end of the observation period, the percentage of T_{reg} in the blood of treated dogs decreased significantly; the changes did not correlate with the treatment response.

The third part of the doctoral research consisted of determining the expression of programmed cell death 1 (PD-1) and its ligands (PD-L1) in the tumours of 30 dogs treated with a combination of ECT and IL-12 GET. In the study, 21 dogs with mast cell tumours and 9 with oral melanomas were included. The expression of PD-1 and PD-L1 was evaluated with immunohistochemical staining, using primary rabbit antibodies against human PD-1 and PD-L1. The score of the staining, ie. the PD-1 and PD-L1 expression, was obtained by the sum of the staining intensity score and the proportion of stained cells to obtain the PD-1 and PD-L1 expression values (from 0 to 7). PD-1 was expressed in 95,2% mast cell tumours and 100% oral melanomas, and PD-L1 was expressed in all tumours. The median expression of PD-1 and PD-L1 was 4.75 and 5.2, respectively. Based on the median values, we determined the cutoff value between high (> 5) and low (≤ 5) PD-1 and PD-L1 expression. Mast cell tumours had lower expression of PD-1 and PD-L1 than oral melanomas, however, the differences were not significant. Dogs who had tumours with high PD-1 and PD-L1 expression had shorter mean survival times and progression-free survival (PFS) times than those who had tumours with low PD-1 and PD-L1 expression. Dogs with tumours with high PD-1 and PD-L1 expression also had poorer response to treatment, as the disease progressed more frequently than in those with tumours with low PD-1 and PD-L1 expression.

In the last part of the research, owners of dogs treated with ECT and IL-12 GET were offered the Cancer treatment form to assess the health-related quality of life (HRQoL) of the treated dogs and the Owner minitest to evaluate the suitability of the Cancer treatment form. The owners reported that the HRQoL of their dogs improved after treatment. The HRQoL assessment was better in dogs treated with a noninvasive treatment, in those who responded to treatment and in dogs with smaller and cutaneous/subcutaneous tumours. Most owners estimated that the questionnaire completely covered the issue and reflected the quality of life of their dogs.

The results of the doctoral dissertation will facilitate the further treatment of dogs, development of protocols and prediction of the response to treatment with ECT and/or IL-12 GET. The expression of PD-1 and PD-L1 could also serve as a predictive factor in the combined treatment approach in translational oncology. The results of the doctoral research will also be suitable as a starting point for possible new combinations of IL-12 GET with other drugs, such as immune checkpoint inhibitors.

9 ZAHVALE

Mentorici, prof. Nataši Tozon, ker je v preteklih štirih letih nesebično delila svoje znanje, me usmerjala in podpirala pri vseh zastavljenih ciljih. Hvala, ker si si vzela čas, tudi ko ga nisi imela. Iz srca hvala tudi zato, ker si mi vedno pomagala tudi pri osebnih stiskah.

Raziskovalcem z Oddelka za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta, ker so me na svojem oddelku sprejeli kot doma. Prof. Maji Čemažar in prof. Gregorju Serši za prijaznost in številne napotke ter usmeritve pri raziskovalnem delu. Posebna zahvala dr. Urši Lamprecht Tratar, ker me je uvedla v svet raziskovanja in z veliko mero potrpežljivosti ter dobre volje delila svoje znanje o predklinični onkologiji. Dr. Katji Uršič za pomoč pri kliničnem delu in nalezljivo dobro voljo. Katarini, Špeli in Tinkari za pomoč pri obdelavi vzorcev krvi.

Sodelavcem na Kliniki za male živali Veterinarske fakultete. Posebna zahvala dr. Urši Ravnik Verbič – ker mi je bila vedno na voljo kot sodelavka, »cimra« in prava prijateljica. Sari, Darji, Barbari, Esteri, Ani, Martini, Maji, Juretu – ker je bilo delo z njimi lažje. Anestezistom: Alenki, Barbari, Katerini in Maticu, ker so mojim pacientom omogočili miren spanec. Tehnikom, predvsem Mojci, Editi in Renati, za vso pomoč in strpnost pri jemanju vzorcev. Alenki in Aleksandru za skrbno zbiranje in obdelavo vzorcev krvi. Katji in Janku za neprecenljivo pomoč pri delu.

Doc. Tanji Švara in Benjaminu Cerku z Inštituta za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete za prijaznost in pomoč pri zbiranju vzorcev tumorjev.

Doc. Tini Kosjek z Instituta Jožefa Stefana za analizo bleomicina.

Prof. Mojci Kržan z Medicinske fakultete za pomoč pri izračunih farmakokinetičnih parametrov bleomicina. Hvala, ker ste si vzeli čas in mi pomagali, da se nisem izgubila v številkah.

Doc. Sabini Ličen za pomoč pri statističnih izračunih in zato, ker je z Obale zmeraj prinesla nekaj sonca.

Mag. Brigit Grecs Smole za pregled literature.

Mojima dragima Ilirkama, Simoni in Špeli, ker sta na moji poti ves čas navijali zame. Katji, Maši, Niki (in Leonu) za mesečne sestanke. Vsem ostalim prijateljem, ki barvajo moj vsakdan.

Timu za vso razumevanje, oporo in spodbudo, predvsem v trenutkih, ko bi sama že obupala.
Zaslužiš si zlato medaljo za potrpežljivost.

Mami in očetu za neskončno podporo in zato, ker sta ustvarila dom, v katerega se tako rada
vračam. Posebna zahvala mami tudi za železne živce pri lektoriranju naloge. Mitji in Alji, ker
sta verjela vame. In Ralphu, moji sreči na štirih tačkah, ker mi je delal družbo pri pisanju naloge.

10 LITERATURA

1. Yarmush ML, Golberg A, Serša G, Kotnik T, Miklavčič D. Electroporation-based technologies for medicine: Principles, applications, and challenges. *Annu Rev Biomed Eng* 2014; 16(1): 295–320.
2. Čemažar M, Serša G. Recent advances in electrochemotherapy. *Bioelectricity* 2019; 1(4): 204–13.
3. Mali B, Jarm T, Snoj M, Serša G, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* 2012; 39(1): 4–16.
4. Orlowski S, Belehradek J, Paoletti C, Mir LM. Transient electroporabilization of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem Pharmacol* 1988; 37(24): 4727–33.
5. Čemažar M, Tamzali Y, Serša G, et al. Electrochemotherapy in veterinary oncology. *J Vet Intern Med* 2008; 22(4): 826–31.
6. Čemažar M, Jarm T, Serša G. Cancer electrogene therapy with interleukin-12. *Curr Gene Ther* 2010; 10(4): 300–11.
7. Pavlin D, Čemažar M, Serša G, Tozon N. IL-12 based gene therapy in veterinary medicine. *J Transl Med* 2012; 10: e234 (11 str.). doi: 10.1186/1479-5876-10-234
8. Čemažar M, Ambrožič Avguštin J, Pavlin D, et al. Efficacy and safety of electrochemotherapy combined with peritumoral IL-12 gene electrotransfer of canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2017; 15(2): 641–54.
9. Li S, Zhang X, Xia X. Regression of tumor growth and induction of long-term antitumor memory by interleukin 12 electro-gene therapy. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(10): 762–8.
10. Lamprecht Tratar U, Loiacono L, Čemažar M, et al. Gene electrotransfer of plasmid-encoding IL-12 recruits the M1 macrophages and antigen-presenting cells inducing the eradication of aggressive B16F10 murine melanoma. *Mediators Inflamm* 2017; 2017:

e5285890 (11 str.). doi: 10.1155/2017/5285890

11. Daud AI, DeConti RC, Andrews S, et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26(36): 5896–903.
12. Cutrera J, King G, Jones P, et al. Safe and effective treatment of spontaneous neoplasms with interleukin 12 electro-chemo-gene therapy. *J Cell Mol Med* 2015; 19(3): 664–75.
13. Milevoj N, Tratar UL, Nemec A, et al. A combination of electrochemotherapy, gene electrotransfer of plasmid encoding canine IL-12 and cytoreductive surgery in the treatment of canine oral malignant melanoma. *Res Vet Sci* 2019; 122: 40–9.
14. Salvadori C, Švara T, Rocchigiani G, et al. Effects of electrochemotherapy with cisplatin and peritumoral IL-12 gene electrotransfer on canine mast cell tumors: a histopathologic and immunohistochemical study. *Radiol Oncol* 2017; 51(3): 286–94.
15. Reed SD, Fulmer A, Buckholz J, et al. Bleomycin/interleukin-12 electrochemogenetherapy for treating naturally occurring spontaneous neoplasms in dogs. *Cancer Gene Ther* 2010; 17(8): 571–8.
16. Tozon N, Lamprecht Tratar U, Žnidar K, et al. Operating procedures of the electrochemotherapy for treatment of tumor in dogs and cats. *J Vis Exp* 2016; (116): e54760 (9 str.). doi: 10.3791/54760
17. Domenge C, Orlowski S, Luboinski B, et al. Antitumor electrochemotherapy: new advances in the clinical protocol. *Cancer* 1996; 77(5): 956–63.
18. Kosjek T, Krajnc A, Gornik T, et al. Identification and quantification of bleomycin in serum and tumor tissue by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Talanta* 2016; 160: 164–71.
19. Grošelj A, Kržan M, Kosjek T, et al. Bleomycin pharmacokinetics of bolus bleomycin dose in elderly cancer patients treated with electrochemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016; 77(5): 939–47.
20. Grošelj A, Bošnjak M, Strojan P, et al. Efficiency of electrochemotherapy with reduced

- bleomycin dose in the treatment of nonmelanoma head and neck skin cancer: preliminary results. Head Neck 2018; 40(1): 120–5.
21. Jamšek Č, Serša G, Bošnjak M, Grošelj A. Long term response of electrochemotherapy with reduced dose of bleomycin in elderly patients with head and neck non-melanoma skin cancer. Radiol Oncol 2020; 54(1): 79–85.
 22. Biller BJ, Elmslie RE, Burnett RC, Avery AC, Dow SW. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. Vet Immunol Immunopathol 2007; 116(1/2): 69–78.
 23. Biller BJ, Guth A, Burton JH, Dow SW. Decreased ratio of CD8+ T cells to regulatory T cells associated with decreased survival in dogs with osteosarcoma. J Vet Intern Med 2010; 24(5): 1118–23.
 24. Tominaga M, Horiuchi Y, Ichikawa M, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood and tumor-infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. J Vet Diagn Invest 2010; 22(3): 438–41.
 25. O'Neill K, Guth A, Biller B, Elmslie R, Dow S. Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. J Vet Intern Med 2009; 23(4): 875–81.
 26. Horiuchi Y, Tominaga M, Ichikawa M, et al. Relationship between regulatory and type 1 T cells in dogs with oral malignant melanoma. Microbiol Immunol 2010; 54(3): 152–9.
 27. Kim JH, Hur JH, Lee SM, et al. Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. Vet J 2012; 193(1): 222–7.
 28. Lisiecka U, Kostro K, Dudek K, Brodzki A, Czop M. Evaluation of T regulatory lymphocytes and serum concentration of selected cytokines in dogs with perianal tumors. Vet Immunol Immunopathol 2019; 207: 10–7.
 29. Zhao J, Zhao J, Perlman S. Differential effects of IL-12 on Tregs and non-Treg T cells: roles of IFN- γ , IL-2 and IL-2R. PLoS One 2012; 7(9): e46241 (12 str.). doi: 10.1371/journal.pone.0046241
 30. Serša G, Teissie J, Čemažar M, et al. Electrochemotherapy of tumors as *in situ*

vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64(10): 1315–27.

31. He J, Hu Y, Hu M, Li B. Development of PD-1/PD-L1 pathway in tumor immune microenvironment and treatment for non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 2015; 5: e13110 (9 str.). doi: 10.1038/srep13110
32. Maekawa N, Konnai S, Okagawa T, et al. Immunohistochemical analysis of PD-L1 expression in canine malignant cancers and PD-1 expression on lymphocytes in canine oral melanoma. *PLoS One* 2016; 11(6): e0157176 (13 str.). doi: 10.1371/journal.pone.0157176
33. Hino R, Kabashima K, Kato Y, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 2010; 116(7): 1757–66.
34. Shi SJ, Wang LJ, Wang GD, et al. B7-H1 expression is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma and regulates the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells. *PLoS One* 2013; 8(10): e76012 (11 str.). doi: 10.1371/journal.pone.0076012
35. Nomi T, Sho M, Akahori T, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(7): 2151–7.
36. Muenst S, Schaeerli AR, Gao F, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 146(1): 15–24.
37. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(9): 3360–5.
38. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res* 2006; 66(7): 3381–5.
39. Hartley G, Faulhaber E, Caldwell A, et al. Immune regulation of canine tumour and

- macrophage PD-L1 expression. *Vet Comp Oncol* 2017; 15(2): 534–49.
40. Maekawa N, Konnai S, Ikeuchi R, et al. Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- γ production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. *PLoS One* 2014; 9(6): e98415 (14 str.). doi: 10.1371/journal.pone.0098415
 41. Shosu K, Sakurai M, Inoue K, et al. Programmed cell death ligand 1 expression in canine cancer. *In Vivo* 2016; 30(3): 195–204.
 42. Lynch S, Savary-Bataille K, Leeuw B, Argyle DJ. Development of a questionnaire assessing health-related quality-of-life in dogs and cats with cancer. *Vet Comp Oncol* 2011; 9(3): 172–82.
 43. Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Görtner F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl Res* 2012; 159(3): 165–72.
 44. Gardner HL, Fenger JM, London CA. Dogs as a model for cancer. *Annu Rev Anim Biosci* 2016; 4: 199–222.
 45. Vail DM, Thamm DH, Liptak JM. Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. 6th ed. St. Louis : Elsevier, 2020: 20–1.
 46. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends: an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016; 25(1): 16–27.
 47. Simpson RM, Bastian BC, Michael HT, et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014; 27(1): 37–47.
 48. Hernandez B, Adissu HA, Wei BR, et al. Naturally occurring canine melanoma as a predictive comparative oncology model for human mucosal and other triple wild-type melanomas. *Int J Mol Sci* 2018; 19(2): 1–19.
 49. Böck BC, Stein U, Schmitt CA, Augustin HG. Mouse models of human cancer. *Cancer Res* 2014; 74(17): 4671–5.
 50. Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(2): 147–56.
 51. Khanna C, Lindblad-Toh K, Vail D, et al. The dog as a cancer model. *Nat Biotechnol*

- 2006; 24(9): 1065–6.
52. Kotnik T, Puciha G, Miklavčič D. Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation- mediated molecular transport. *J Membr Biol* 2010; 236(1): 3–13.
 53. Jiang C, Davalos RV, Bischof JC. A review of basic to clinical studies of irreversible electroporation therapy. *IEEE Trans Biomed Eng* 2015; 62(1): 4–20.
 54. Davalos RV, Mir LM, Rubinsky B. Tissue ablation with irreversible electroporation. *Ann Biomed Eng* 2005; 33(2): 223–31.
 55. Miklavčič D, Mali B, Kos B, Heller R, Serša G. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *Biomed Eng Online* 2014; 13(1): e29 (20 str.).
doi: 10.1186/1475-925X-13-29
 56. Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Enhancement of cytotoxicity by electroporation: an improved method for screening drugs. *Anticancer Drugs* 1998; 9(4): 319–25.
 57. Serša G, Čemažar M, Miklavčič D, Mir LM. Electrochemotherapy: variable anti-tumor effect on different tumor models. *Bioelectrochem Bioenerg* 1994; 35: 23–7.
 58. Jaroszeski MJ, Dang V, Pottinger C, et al. Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation *in vitro*. *Anticancer Drugs* 2000; 11(3): 201–8.
 59. Impellizeri J, Aurisicchio L, Forde P, Soden DM. Electroporation in veterinary oncology. *Vet J* 2016; 217: 18–25.
 60. Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Vascular reactions to *in vivo* electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1569(1/3): 51–8.
 61. Serša G, Jarm T, Kotnik T, et al. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *Br J Cancer* 2008; 98(2): 388–98.
 62. Miklavčič D, Serša G, Breclj E, et al. Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. *Med Biol Eng Comput* 2012; 50(12): 1213–25.

63. Calvet CY, Famin D, André FM, Mir LM. Electrochemotherapy with bleomycin induces hallmarks of immunogenic cell death in murine colon cancer cells. *Oncoimmunology* 2014; 3(4): 2–11.
64. Campana LG, Testori A, Curatolo P, Quaglino P. Treatment efficacy with electrochemotherapy: a multi-institutional prospective observational study on 376 patients with superficial tumors. *Eur J Surg Oncol* 2016; 42(12): 1914–23.
65. Campana LG, Clover AJP, Valpione S, et al. Recommendations for improving the quality of reporting clinical electrochemotherapy studies based on qualitative systematic review. *Radiol Oncol* 2016; 50(1): 1–13.
66. Djokić M, Čemažar M, Popović P, et al. Electrochemotherapy as treatment option for hepatocellular carcinoma, a prospective pilot study. *Eur J Surg Oncol* 2018; 44(5): 651–7.
67. Coletti L, Battaglia V, De Simone P, et al. Safety and feasibility of electrochemotherapy in patients with unresectable colorectal liver metastases: a pilot study. *Int J Surg* 2017; 44: 26–32.
68. Edhemović I, Brecelj E, Gašljević G, et al. Intraoperative electrochemotherapy of colorectal liver metastases. *J Surg Oncol* 2014; 110(3): 320–7.
69. Probst U, Fuhrmann I, Beyer L, Wiggermann P. Electrochemotherapy as a new modality in interventional oncology: a review. *Technol Cancer Res Treat* 2018; 17: e1533033818785329 (12 str.). doi: 10.1177/1533033818785329
70. Cornelis FH, Ben Ammar M, Nouri-Neuville M, et al. Percutaneous image-guided electrochemotherapy of spine metastases: initial experience. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2019; 42(12): 1806–9.
71. Falk Hansen H, Bourke M, Stigaard T, et al. Electrochemotherapy for colorectal cancer using endoscopic electroporation: a phase 1 clinical study. *Endosc Int Open* 2020; 8(2): e124-e132 (9 str.). doi: 10.1055/a-1027-6735
72. Klein N, Gunther E, Zapf S, et al. Prostate cancer infiltrating the bladder sphincter successfully treated with electrochemotherapy: a case report. *Clin Case Reports* 2017; 5(12): 2127–32.

73. Egeland C, Baeksgaard L, Johannessen H, et al. Endoscopic el-ectrochemotherapy for esophageal cancer: a phase I clinical study. *Endosc Int Open* 2018; 6(6): 727–34.
74. Kodre V, Čemažar M, Pečar J, et al. Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. *In Vivo* 2009; 23(1): 55–62.
75. Tozon N, Kodre V, Serša G, Čemažar M. Effective treatment of perianal tumors in dogs with electrochemotherapy. *Anticancer Res* 2005; 25(2A): 839–45.
76. Spugnini EP, Di Tosto G, Salemme S, et al. Electrochemotherapy for the treatment of recurring aponeurotic fibromatosis in a dog. *Can Vet J* 2013; 54(6): 606–9.
77. Torrigiani F, Pierini A, Lowe R, Simčič P, Lubas G. Soft tissue sarcoma in dogs: a treatment review and a novel approach using electrochemotherapy in a case series. *Vet Comp Oncol* 2019; 17(3): 234–41.
78. Simčič P, Lowe R, Granziera V, Pierini A, Torrigiani F, Lubas G. Electrochemotherapy in treatment of canine oral non-tonsillar squamous cell carcinoma: a case series report. *Vet Comp Oncol* 2020; 18(3): 428–32.
79. Tozon N, Pavlin D, Serša G, Dolinšek T, Čemažar M. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin injection: an observational study in superficial squamous cell carcinoma in cats. *J Feline Med Surg* 2014; 16(4): 291–9.
80. Tamzali Y, Borde L, Rols MP, et al. Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: a retrospective study of 48 cases. *Equine Vet J* 2012; 44(2): 214–20.
81. Tozon N, Kramarič P, Kos Kadunc V, Serša G, Čemažar M. Electrochemotherapy as a single or adjuvant treatment to surgery of cutaneous sarcoid tumours in horses: a 31-case retrospective study. *Vet Rec* 2016; 179(24): e627 (6 str.). doi: 10.1136/vr.103867
82. Spugnini EP, Lanza A, Sebasti S, Baldi A. Electrochemotherapy palliation of an oral squamous cell carcinoma in an African hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Vet Res Forum* 2018; 9(4): 379–81.
83. Račnik J, Švara T, Zadravec M, et al. Electrochemotherapy with cisplatin for the treatment of a non-operable cutaneous fibroma in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*).

- N Z Vet J 2019; 67(3): 155–8.
84. Račnik J, Švara T, Zadravec M, et al. Electrochemotherapy with bleomycin of different types of cutaneous tumours in a ferret (*Mustela putorius furo*). Radiol Oncol 2018; 52(1): 98–104.
 85. Lanza A, Pettorali M, Baldi A, Spugnini EP. Surgery and electrochemotherapy treatment of incompletely excised mammary carcinoma in two male pet rats (*Rattus norvegicus*). J Vet Med Sci 2017; 79(3): 623–5.
 86. Lanza A, Baldi A, Spugnini EP. Surgery and electrochemotherapy for the treatment of cutaneous squamous cell carcinoma in a yellow-bellied slider (*Trachemys scripta scripta*). J Am Vet Med Assoc 2015; 246(4): 455–7.
 87. Brunner CHM, Dutra G, Silva CB, Silveira LMG, Monteiro Martins M de F. Electrochemotherapy for the treatment of fibropapillomas in *Chelonia mydas*. J Zoo Wildl Med 2014; 45(2): 213–8.
 88. Lowe R, Gavazza A, Impellizeri JA, Soden DM, Lubas G. The treatment of canine mast cell tumours with electrochemotherapy with or without surgical excision. Vet Comp Oncol 2017; 15(3): 775–84.
 89. Spugnini EP, Baldi A. Electrochemotherapy in veterinary oncology: state-of-the-art and perspectives. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2019; 49(5): 967–79.
 90. Maglietti F, Tellado M, Olaiz N, Michinski S, Marshall G. Minimally invasive electrochemotherapy procedure for treating nasal duct tumors in dogs using a single needle electrode. Radiol Oncol 2017; 51(4): 422–30.
 91. Spugnini EP, Menicagli F, Pettorali M, Baldi A. Ultrasound guided electrochemotherapy for the treatment of a clear cell thymoma in a cat. Open Vet J 2017; 7(1): 57–60.
 92. Ghosh S. Cisplatin: the first metal based anticancer drug. Bioorg Chem 2019; 88: e102925 (20 str.). doi: 10.1016/j.bioorg.2019.102925
 93. Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. Vet Comp Oncol 2008; 6(1): 1–18.

94. Tozon N, Serša G, Čemažar M. Electrochemotherapy: potentiation of local antitumour effectiveness of cisplatin in dogs and cats. *Anticancer Res* 2001; 21(4A): 2483–8.
95. Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y. New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot* 1966; 19(5): 200–9.
96. Froudarakis M, Hatzimichael E, Kyriazopoulou L, et al. Revisiting bleomycin from pathophysiology to safe clinical use. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013; 87(1): 90–100.
97. Poddevin B, Orlowski S, Belehradek J, Mir LM. Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 67–75.
98. Pron G, Mahrour N, Orlowski S, et al. Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism. *Biochem Pharmacol* 1999; 57(1): 45–56.
99. Chen J, Stubbe J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 102–12.
100. Wittenburg LA, Gustafson DL. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Riviere JE, Papich MG, eds. Veterinary pharmacology and therapeutics. 10th ed. Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell, 2018: 1191–226.
101. Plumb DC. Plumb's veterinary drug handbook. 9th ed. Stockholm, Wisconsin : PharmaVet, 2018: 131–3.
102. Kelly JM, Belding BA, Schaefer AK. Acanthomatous ameloblastoma in dogs treated with intralesional bleomycin. *Vet Comp Oncol* 2010; 8(2): 81–6.
103. Groselj A, Kranjc S, Bošnjak M, et al. Vascularization of the tumours affects the pharmacokinetics of bleomycin and the effectiveness of electrochemotherapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2018; 123(3): 247–56.
104. Gehl J, Serša G, Matthiessen LW, et al. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncol* 2018; 57(7): 874–82.
105. Strong JE, Schurig JE, Issell BF, et al. Pharmacokinetics of tallysomycin and bleomycin in the beagle dog. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 1821–7.

106. Rosazza C, Meglic SH, Zumbusch A, Rols MP, Miklavcic D. Gene electrotransfer: a mechanistic perspective. *Curr Gene Ther* 2016; 16(2): 98–129.
107. Katz AB, Taichman LB. Epidermis as a secretory tissue: an in vitro tissue model to study keratinocyte secretion. *J Invest Dermatol* 1994; 102(1): 55–60.
108. Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 2007; 13(16): 4677–85.
109. Pavlin D, Čemažar M, Kamenšek U, et al. Local and systemic antitumor effect of intratumoral and peritumoral IL-12 electrogene therapy on murine sarcoma. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(22): 2114–22.
110. Berraondo P, Etxeberria I, Ponz-Sarvise M, Melero I. Revisiting interleukin-12 as a cancer immunotherapy agent. *Clin Cancer Res* 2018; 24(12): 2716–8.
111. Pavlin D, Čemažar M, Cör A, et al. Electrogene therapy with interleukin-12 in canine mast cell tumors. *Radiol Oncol* 2011; 45(1): 31–9.
112. Li S, Zhang L, Torrero M, Cannon M, Barret R. Administration route- and immune cell activation-dependent tumor eradication by IL12 electrotransfer. *Mol Ther* 2005; 12(5): 942–9.
113. Lucas ML, Heller L, Coppola D, Heller R. IL-12 plasmid delivery by *in vivo* electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma. *Mol Ther* 2002; 5(6): 668–75.
114. Heinzerling LM, Feige K, Rieder S, et al. Tumor regression induced by intratumoral injection of DNA coding for human interleukin 12 into melanoma metastases in gray horses. *J Mol Med* 2001; 78(12): 692–702.
115. Chuang TF, Lee SC, Liao KW, et al. Electroporation-mediated IL-12 gene therapy in a transplantable canine cancer model. *Int J Cancer* 2009; 125(3): 698–707.
116. Sedlar A, Kranjc S, Dolinšek T, et al. Radiosensitizing effect of intratumoral interleukin-12 gene electrotransfer in murine sarcoma. *BMC Cancer* 2013; 13: e38 (11 str.). doi: 10.1186/1471-2407-13-38
117. Cutrera J, Torrero MN, Shiomitsu K, Mauldin N, Li S. Intratumoral bleomycin and IL-

- 12 electrochemogenotherapy for treating head and neck tumors in dogs. *Methods Mol Biol* 2008; 423: 319–25.
118. Lamprecht U, Kamenšek U, Štimac M, et al. Gene electrotransfer of canine interleukin 12 into canine melanoma cell lines. *J Membr Biol* 2015; 248(5): 909–17.
119. Kalbasi A, Haas N, June CH, Vapiwala N. Radiation and immunotherapy: a synergistic combination. *J Clin Invest* 2013; 123(7): 2756–63.
120. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, et al. Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol* 2015; 35: S185–98.
121. Gelao L, Criscitiello C, Fumagalli L, et al. Tumour dormancy and clinical implications in breast cancer. *Ecancermedicalscience* 2013; 7(1): e320 (15 str.). doi: 10.3332/ecancer.2013.320
122. Day MJ. Clinical immunology of the dog and cat. 2nd ed. London : Manson Publishing, 2011: 11–61.
123. Walter CU, Biller BJ, Lana SE, Bachand AM, Dow SW. Effects of chemotherapy on immune responses in dogs with cancer. *J Vet Intern Med* 2006; 20(2): 342–7.
124. Winnicka A, Jagielski D, Hoffmann-Jagielska M, Lechowski R. Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy. *J Vet Med Ser A Physiol Pathol Clin Med* 2002; 49(6): 303–6.
125. Shi G, Edelblute C, Arpag S, Lundberg C, Heller R. IL-12 gene electrotransfer triggers a change in immune response within mouse tumors. *Cancers* 2018; 10(12): e498 (19 str.). doi: 10.3390/cancers10120498
126. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(4): 295–307.
127. Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, et al. Enhanced functionality of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1032–40.
128. Gasparoto TH, De Souza Malaspina TS, Benevides L, et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive

- regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 10: 942–9.
129. Lisiecka U, Kostro K. Mechanisms of tumour escape from immune surveillance. *J Vet Res* 2016; 60(4): 453–60.
130. Whelan MC, Casey G, MacConmara M, et al. Effective immunotherapy of weakly immunogenic solid tumours using a combined immunogene therapy and regulatory T-cell inactivation. *Cancer Gene Ther* 2010; 17(7): 501–11.
131. Forde PF, Sadadcharam M, Hall LJ, et al. Enhancement of electroporation facilitated immunogene therapy via T-reg depletion. *Cancer Gene Ther* 2014; 21(8): 349–54.
132. Sato E, Olson SH, Ahn J, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(51): 18538–43.
133. Leffers N, Gooden MJM, De Jong RA, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58(3): 449–59.
134. Gao Q, Qiu SJ, Fan J, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007; 25(18): 2586–93.
135. Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, et al. Tumor infiltrating FOXP3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 2006; 107(12): 2866–72.
136. Li Q, Virtuoso LP, Anderson CD, Egilmez NK. Regulatory rebound in IL-12-treated tumors is driven by uncommitted peripheral regulatory T cells. *J Immunol* 2015; 195(3): 1293–1300.
137. Folkl A, Bienzle D. Structure and function of programmed death (PD) molecules. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 134(1/2): 33–8.
138. Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, Bower M, Pinato DJ. Pd-L1. *J Clin Pathol* 2018; 71(3): 189–94.

139. Nemoto Y, Shosu K, Okuda M, Noguchi S, Mizuno T. Development and characterization of monoclonal antibodies against canine PD-1 and PD-L1. *Vet Immunol Immunopathol* 2018; 198: 19–25.
140. Darb-Esfahani S, Kunze CA, Kulbe H, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumorinfiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(2): 1486–99.
141. Kluger HM, Zito CR, Barr ML, et al. Characterization of PD-L1 expression and associated T-cell infiltrates in metastatic melanoma samples from variable anatomic sites. *Clin Cancer Res* 2015; 21(13): 3052–60.
142. Schmidt LH, Kümmel A, Görlich D, et al. PD-1 and PD-L1 expression in NSCLC indicate a favorable prognosis in defined subgroups. *PLoS One* 2015; 10(8): e0136023 (15 str.). doi: 10.1371/journal.pone.0136023
143. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(4): 375–84.
144. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, et al. Nivolumab for metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2015; 33(13): 1430–7.
145. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 362(3): 397–406.
146. Powles T, Eder JP, Fine GD, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 2014; 515(7528): 558–62.
147. Lee SM, Chow LQ. A new addition to the PD-1 checkpoint inhibitors for non-small cell lung cancer-the anti-PDL1 antibody-MEDI4736. *Transl Lung Cancer Res* 2014; 3(6): 408–10.
148. Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci* 2017; 24(1): e26 (11 str.). doi: 10.1186/s12929-017-0329-9

149. Heppt M V, Eigenthaler TK, Kähler KC, et al. Immune checkpoint blockade with concurrent electrochemotherapy in advanced melanoma: a retrospective multicenter analysis American Joint Committee on Cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2016; 65(8): 951–9.
150. Hartley G, Elmslie R, Dow S, Guth A. Checkpoint molecule expression by B and T cell lymphomas in dogs. *Vet Comp Oncol* 2018; 16(3): 352–60.
151. Coy J, Caldwell A, Chow L, Guth A, Dow S. PD-1 expression by canine T cells and functional effects of PD-1 blockade. *Vet Comp Oncol* 2017; 15(4): 1487–502.
152. Maekawa N, Konnai S, Takagi S, et al. A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma. *Sci Rep* 2017; 7(1): e8951 (12 str.). doi: 10.1038/s41598-017-09444-2
153. McDermott DF, Atkins MB. PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Med* 2013; 2(5): 662–73.
154. Belshaw Z, Yeates J. Assessment of quality of life and chronic pain in dogs. *Vet J* 2018; 239: 59–64.
155. Cella DF. Overcoming difficulties in demonstrating health outcome benefits. *J Parenter Enter Nutr* 1992; 16: 106–11.
156. Bottomley A, Flechtner H, Efficace F, et al. Health related quality of life outcomes in cancer clinical trials. *Eur J Cancer* 2005; 41(12): 1697–709.
157. Silva NEOF, Luna SPL, Joaquim JGF, Coutinho HD, Possebon FS. Effect of acupuncture on pain and quality of life in canine neurological and musculoskeletal diseases. *Can Vet J* 2017; 58(9): 41–51.
158. Budke CM, Levine JM, Kerwin SC, et al. Evaluation of a questionnaire for obtaining owner-perceived, weighted quality-of-life assessments for dogs with spinal cord injuries. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233(6): 925–30.
159. Freeman LM, Rush JE, Farabaugh AE, Must A. Development and evaluation of a questionnaire for assessing health-related quality of life in dogs with cardiac disease.

- Am J Vet Res 2005; 226(11): 1864–8.
160. Oyama MA, Rush JE, O’Sullivan ML, et al. Perceptions and priorities of owners of dogs with heart disease regarding quality versus quantity of life for their pets. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233(1): 104–8.
 161. Yam PS, Butowski CF, Chitty JL, et al. Impact of canine overweight and obesity on health-related quality of life. *Prev Vet Med* 2016; 127: 64–9.
 162. Niessen SJM, Powney S, Guitian J, et al. Evaluation of a quality-of-life tool for dogs with diabetes mellitus. *J Vet Intern Med* 2012; 26(4): 953–61.
 163. Schofield I, O’Neill DG, Brodbelt DC, et al. Development and evaluation of a health-related quality-of-life tool for dogs with Cushing’s syndrome. *J Vet Intern Med* 2019; 33(6): 2595–604.
 164. Wessmann A, Volk HA, Packer RMA, Ortega M, Anderson TJ. Quality-of-life aspects in idiopathic epilepsy in dogs. *Vet Rec* 2016; 179(9): 229.
 165. Packer RMA, Volk HA. Epilepsy beyond seizures: A review of the impact of epilepsy and its comorbidities on health-related quality of life in dogs. *Vet Rec* 2015; 177(12): 306–15.
 166. Noli C, Minafò G, Galzerano M. Quality of life of dogs with skin diseases and their owners. Part 1: development and validation of a questionnaire. *Vet Dermatol* 2011; 22(4): 335–43.
 167. Noli C, Colombo S, Cornegliani L, et al. Quality of life of dogs with skin disease and of their owners. Part 2: administration of a questionnaire in various skin diseases and correlation to efficacy of therapy. *Vet Dermatol* 2011; 22(4): 344–51.
 168. Greenhalgh SN, Reeve JA, Johnstone T, et al. Long-term survival and quality of life in dogs with clinical signs associated with a congenital portosystemic shunt after surgical or medical treatment. *J Am Vet Med Assoc* 2014; 236(11): 1215–20.
 169. Faustino L, Lallo M. Quality of life and pain in dogs with early-stage mammary tumours. *Acta Vet Hung* 2015; 63(4): 451–7.
 170. Vøls KK, Heden MA, Kristensen AT, Sandøe P. Quality of life assessment in dogs and

- cats receiving chemotherapy: a review of current methods. *Vet Comp Oncol* 2017; 15(3): 684–91.
171. Bergmann M, Sauter-Louis C, Hirschberger J. Quality of life and life expectancy of dogs undergoing chemotherapy for malignant lymphoma: an owner survey. *Tie* 2011; 39(4): 229–36.
172. London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, et al. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clin Cancer Res* 2009; 15(11): 3856–65.
173. Hill M, Hirschberger J, Zimmermann K, et al. Quality of life in primary and adjuvant veterinary radiation therapy: an owner survey. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2014; 42(3): 157–65.
174. Smith PAD, Burnside S, Helm JR, Morris JS. Owner perceptions of radiotherapy treatment for veterinary patients with cancer. *Vet Comp Oncol* 2019; 17(3): 221–33.
175. Scheltema MJ, Chang JI, van den Bos W, et al. Impact on genitourinary function and quality of life following focal irreversible electroporation of different prostate segments. *Diagn Interv Radiol* 2018; 24(5): 268–75.
176. Tellado MN, Maglietti FH, Michinski SD, Marshall GR, Signori E. Predictive factors of response to electrochemotherapy in canine oral malignant melanoma. *Radiol Oncol* 2020; 54(1): 68–78.
177. Price GS, Frazier DL. Use of body surface area (BSA)-based dosages to calculate chemotherapeutic drug dose in dogs: I. Potential problems with current BSA formulae. *J Vet Intern Med* 1998; 12(4): 267–71.
178. Su L, Townsend KL, Au J, Wittum TE. Comparison of tibial plateau angles in small and large breed dogs. *Can Vet J* 2015; 56(6): 610–4.
179. Hawthorne AJ, Booles D, Nugent PA, Gettinby G, Wilkinson J. Body-weight changes

- during growth in puppies of different breeds. *J Nutr* 2004; 134(8): 2022–6.
180. Cattai A, Bizzotto R, Cagnardi P, Di Cesare F, Franci P. A pharmacokinetic model optimized by covariates for propofol target-controlled infusion in dogs. *Vet Anaesth Analg* 2019; 46(5): 568–78.
181. Kos Š, Vanvarenberg K, Dolinšek T, et al. Gene electrotransfer into skin using noninvasive multi-electrode array for vaccination and wound healing. *Bioelectrochemistry* 2017; 114: 33–41.
182. 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.
183. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 1984; 21(5): 469–74.
184. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol* 2011; 48(1): 147–55.
185. Owen LN, ed. TNM classification of tumours in domestic animals. Geneva : World Health Organization, 1980: 14–5.
186. Owen LN, ed. TNM classification of tumours in domestic animals. Geneva : World Health Organization, 1980: 23–4.
187. Sampedro-Núñez M, Serrano-Somavilla A, Adrados M, et al. Analysis of expression of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint system and its prognostic impact in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Sci Rep* 2018; 8(1): e17812 (11 str.).
doi: 10.1038/s41598-018-36129-1
188. Mino-Kenudson M. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression by immunohistochemistry: could it be predictive and/or prognostic in non-small cell lung cancer? *Cancer Biol Med* 2016; 13(2): 157–70.
189. Xu Y, Prohn M, Cai X, et al. Direct comparison of radioimmunoassay and LC-MS/MS for PK assessment of insulin glargine in clinical development. *Bioanalysis* 2014; 6(24):

- 3311–23.
190. Smith DA, Beaumont K, Maurer TS, Di L. Volume of distribution in drug design. *J Med Chem* 2015; 58(15): 5691–8.
 191. Ito S. Pharmacokinetics 101. *Paediatr Child Health* 2011; 16(9): 535–6.
 192. Joerger M. Covariate pharmacokinetic model building in oncology and its potential clinical relevance. *AAPS J* 2012; 14(1): 119–32.
 193. Galis F, Van Der Sluijs I, Van Dooren TJM, Metz JAJ, Nussbaumer M. Do large dogs die young? *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2007; 308(2): 119–26.
 194. Hayek MG, Davenport GM. Nutrition and aging in companion animals. *J Anti Aging Med* 1998; 1(2): 117–23.
 195. Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Kolar LM, Klausner JS. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 214(9): 1336–41.
 196. Reid J, Nolan AM. Pharmacokinetics of propofol as an induction agent in geriatric dogs. *Res Vet Sci* 1996; 61(2): 169–171.
 197. Dowling PM. Geriatric pharmacology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2005; 35(3): 557–69.
 198. Goy-Thollot I, Chafotte C, Besse S, Garnier F, Barthez PY. Iohexol plasma clearance in healthy dogs and cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2006; 47(2): 168–73.
 199. Broughton A, Strong JE, Holoye PY, Bedrossian CW. Clinical pharmacology of bleomycin following intravenous infusion as determined by radioimmunoassay. *Cancer* 1977; 40(6): 2772–8.
 200. Crooke ST, Comis RL, Einhorn LH, et al. Effects of variations in renal function on the clinical pharmacology of bleomycin administered as an iv bolus. *Cancer Treat Rep* 1977; 61(9): 1631–6.
 201. Von Hendy-Willson VE, Pressler BM. An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats. *Vet J* 2011; 188(2): 156–65.

202. Baggot JD. Clinical pharmacokinetics in veterinary medicine. *Clin Pharmacokinet* 1992; 22(4): 254–73.
203. Yee GC, Crom WHR, Lee FH, Smyth RD, Evans WE. Bleomycin disposition in children with cancer. *Clin Pharmacol Ther* 1982; 33(5): 668–73.
204. Kramer WG, Feldman S, Broughton A, et al. The pharmacokinetics of bleomycin in man. *J Clin Pharmacol* 1978; 18(7): 346–52.
205. Galon J. Type, density, and location of immune cells within human v colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313(5795): 1960–4.
206. Žagar Ž. Klinično-patološke značilnosti kožnih mastocitomov psov, pomembne za napoved poteka bolezni. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2018. Prešernova raziskovalna naloga
207. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 2015; 14(4): 847–56.
208. Balar AV, Weber JS. PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: current status and future directions. *Cancer Immunol Immunother* 2017; 66(5): 551–64.
209. Choi JW, Withers SS, Chang H, et al. Development of canine PD-1/PD-L1 specific monoclonal antibodies and amplification of canine T cell function. *PLoS One* 2020; 15(7): e0235518 (23 str.). doi: 10.1371/journal.pone.0235518

11 PRILOGE

Priloga 1: Pojasnilo lastniku živali

Pojasnilo lastniku živali

Študija: "KOMBINACIJA KIRURGIJE ALI ELEKTROKEMOTERAPIJE IN GENSKEGA ELEKTROPRENOSA GOLE PLAZMIDNE DNA Z ZAPISOM ZA PASJI INTERLEVINK 12 ZA ZDRAVLJENJE ORALNIH IN KOŽNIH TUMORJEV PSOV"

ELEKTROKEMOTERAPIJA IN ELEKTROGENSKA TERAPIJA

Elektroporacija je metoda, pri kateri z uporabo električnega polja prehodno destabiliziramo celično membrano, tako da postane prehodna za snovi, ki sicer ne morejo prehajati prek nje. Električno polje deluje na celično membrano, tako da v njej nastanejo reverzibilne pore. Tako lahko v celico vnašamo najrazličnejše biološke makromolekule, npr. DNA, RNA, protitelesa, encime, pa tudi kemoterapevtike, ki sicer težko prehajajo skozi membrano. Kombinacija električnih pulzov in kemoterapevtikov se imenuje elektrokemoterapija in se že vrsto let uporablja za zdravljenje kožnih in podkožnih tumorjev v humani in veterinarski medicini, tudi na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete. Kombinacija uporabe električnih pulzov in DNA se imenuje elektrogenska terapija.

Elektrokemoterapija

Elektrokemoterapija je učinkovit način lokalnega zdravljenja tumorjev, pri kateri z uporabo električnih sunkov povečamo vnos kemoterapevtika v tumorje. Uporabljena bosta dva kemoterapevtika, ki se uporabljata tudi v kliničnih protokolih kemoterapije. To sta bleomicin in cisplatin, ki sta primerni izbiri, zato ker sama po sebi težko prehajata skozi celično membrano, ob aplikaciji električnih sunkov pa se njuna citotoksičnost zelo poveča zaradi nespecifičnega vnosa v celice.

Elektrogenska terapija

To je zdravljenje, kjer uporabljamo električne pulze za vnos DNA v celice. Z vnašanjem DNA v celice lahko vplivamo ali popravimo spremenjeno delovanje rakavih celic. Z naraščajočim znanjem na področju molekularne biologije se genska terapija v humani medicini vedno

pogosteje uporablja za zdravljenje raka. V svetu trenutno poteka več kot 1000 kliničnih študij genske terapije pri ljudeh.

Namen študije

S privolitvijo za sodelovanje vaše živali v tej študiji boste pripomogli k napredku znanja o elektrokemoterapiji in elektrogenski terapiji. Upamo, da bomo lahko s pomočjo rezultatov študije v veterinarsko medicino uvedli novo metodo za zdravljenje rakavih obolenj.

Z raziskavo bomo ugotavljali, ali lahko s kombinacijo kemoterapevtika in gena, ki kodira nastanek imunske molekule interlevkina 12, vplivamo na zaviranje rasti in razvoja raka pri psih. Za to molekulo (beljakovino) je bilo do zdaj v številnih raziskavah na laboratorijskih živalih in tudi v humanih kliničnih študijah ugotovljeno, da zavira rast in metastaziranje različnih tumorjev in podaljšuje življenje.

Električni pulzi za vnos kemoterapevtika in DNA v celice so že bili preskušeni pri psih in jih po naših izkušnjah večina psov dobro prenaša. Edini stranski učinek elektrokemoterapije ali elektrogenske terapije, ki smo ga do zdaj ugotovili, je blažja rdečina in otekлина na mestu aplikacije, ki sama izzveni v enem dnevu.

Potek terapije: postopek bo izведен v kratki splošni anesteziji.

Elektrokemoterapija: živali bomo v tumor vbrizgali kemoterapevtik in v 10-20 minutah na injicirana mesta aplicirali električne pulze. Tako bomo omogočili prehajanje kemoterapevtika v celice.

Elektrogenska terapija: živali bomo v okolico tumorja vbrizgali raztopino DNA in takoj potem na injicirana mesta aplicirali električne pulze. Tako bomo omogočili vstop terapevtskega gena v celice, ki bodo na podlagi zapisa DNA začele proizvajati interlevkin 12.

Po posegu bomo živali aplicirali enkratni odmerek analgetika in ko se bo prebudila iz anestezije, bo odpuščena v domačo oskrbo.

Za ugotavljanje uspešnosti terapije bo treba živali odvzeti kri ob elektrogenski terapiji in nato še 7., 14. in 30. dan po izvedeni terapiji. Druge preiskave, kot sta ultrazvok in rentgensko

slikanje, bodo izvedene v dogovoru z vodjo študije glede na tip novotvorbe in klinično stanje živali.

Priloga 2: Soglasje lastnika živali za sodelovanje v klinični študiji

Soglasje LASTNIKA ŽIVALI

1. Ime in priimek lastnika živali:

Podatki o živali:

2. Izjava lastnika živali:

Podpisani sem kot lastnik zgoraj omenjene živali razumel postopke, ki bodo izvedeni v raziskavi z naslovom: **"KOMBINACIJA KIRURGIJE ALI ELEKTROKEMOTERAPIJE IN GENSKEGA ELEKTROPRENOSA GOLE PLAZMIDNE DNA Z ZAPISOM ZA PASJI INTERLEVINK 12 ZA ZDRAVLJENJE ORALNIH IN KOŽNIH TUMORJEV PSOV"** in dovoljujem sodelovanje svoje živali v tej raziskavi.

Moje sodelovanje v raziskavi je popolnoma prostovoljno in ga lahko odklonim oziroma med raziskavo kadarkoli prekinem.

Obvestili so me, da bodo rezultati te raziskave koristili napredku znanja veterinarske medicine. Vem, da je metodologijo te raziskave pregledala in odobrila etična komisija.

Dobrobiti, tveganja in nevšečnosti, ki bi jim lahko bila podvržena moja žival, mi je razumljivo razložil(a), ki je odgovoren(a) za varen potek raziskave. Povedal(a) mi je tudi, na koga naj se obrnem v primeru določenih nevšečnosti v njegovi/njeni odsotnosti. Zato prostovoljno in obveščeno pristajam na sodelovanje svoje živali v tej raziskavi in se tudi strinjam, da v raziskovalne namene uporabijo vse vzorce, ki bodo odvzeti med raziskavo. Dovoljujem tudi, da se izsledke raziskave lahko objavi in da se uporabi slikovno gradivo, kjer pa ne bo razkrita identiteta psa oz. lastnika.

Podpis lastnika živali Datum.....

Izjava raziskovalca

Podpisani(a) sem razumljivo razložil(a) lastniku živali dobrobiti, tveganja in nevšečnosti sodelovanja v raziskavi.

Podpis raziskovalca..... Datum.....

Priča:

Priloga 3: Vprašalnik o kakovosti življenja zdravljenih živali

VPRAŠALNIK

Spoštovani lastniki hišnih ljubljenčkov!

Pred vami je vprašalnik, s katerim želimo raziskati kakovost življenja vaših ljubljenčkov pred zdravljenjem in po njem. Prosimo vas, da na vprašanja odgovorite, tako da obkrožite ustreznou stevilko ali odgovor.

Vsi podatki, ki bodo zbrani v tej raziskavi, bodo obravnavani zaupno. Zagotavljamo vam, da v nobenem poročilu o rezultatih raziskave ne bomo razkrili vaših imen. Ker je sodelovanje v raziskavi prostovoljno, ga lahko kadarkoli prekinete.

Datum anketiranja:	Ime lastnika:				
Ime ljubljenčka:	Telesna masa (v kg): _____ Pasma: _____				

Prosimo obkrožite!

VESELJE: Moj ljubljenček...	Se ne strinjam		Neodločen		Se strinjam
... je igriv.	1	2	3	4	5
... odreagira na mojo bližino.	1	2	3	4	5
... uživa življenje.	1	2	3	4	5
DUŠEVNO STANJE: Moj ljubljenček...	Se ne strinjam		Neodločen		Se strinjam
... ima večino dobrih dni.	1	2	3	4	5
... večino časa spi.	1	2	3	4	5
... se zdi zdolgočasen, depresiven. Ni pozoren.	1	2	3	4	5
BOLEČINA: Moj ljubljenček...	Se ne strinjam		Neodločen		Se strinjam
... ima bolečine.	1	2	3	4	5
... je zasopihan, tudi ko miruje.	1	2	3	4	5
... se občasno trese ali trepata.	1	2	3	4	5
APETIT: Moj ljubljenček...	Se ne strinjam		Neodločen		Se strinjam
... ima normalen apetit.	1	2	3	4	5
... občasno bruha ali mu je slabo.	1	2	3	4	5
... uživa priboljške / prigrizke.	1	2	3	4	5
SPLOŠEN IZGLED: Moj ljubljenček...	Se ne strinjam		Neodločen		Se strinjam

... se občasno ponečedi.	1	2	3	4	5
... zaudarja po urinu ali ima nadraženo kožo.	1	2	3	4	5
... ima mastno dlako in na splošno slab videz.	1	2	3	4	5
HIDRACIJA: Moj ljubljenček...	Se ne strinjam		Neodločen		Se strinjam
... zaužije zadostno količino tekočine.	1	2	3	4	5
... ima občasne driske.	1	2	3	4	5
... normalno urinira.	1	2	3	4	5
MOBILNOST: Moj ljubljenček...	Se ne strinjam		Neodločen		Se strinjam
... se giblje normalno.	1	2	3	4	5
MOBILNOST: Moj ljubljenček...	Se ne strinjam		Neodločen		Se strinjam
... večino dneva preleži kar na istem mestu.	1	2	3	4	5
... je aktiven kot običajno.	1	2	3	4	5

SPLOŠNO ZDRAVJE:	Slabše		Enako		Boljše
Splošno zdravje glede na zadnje ocenjevanje (če ste predhodno že izpolnjevali vprašalnik)	1	2	3	4	5
Splošno zdravje v primerjavi s časom postavitve diagnoze.	1	2	3	4	5

Prosimo, označite s svinčnikom na premici:

KAKO BI OCENILI TRENTUTNO KAKOVOST ŽIVLJENJA SVOJEGA LJUBLJENČKA

Zelo slabo _____ Odlično _____

Prosimo, označite en odgovor:

Ali tudi sami oskrbujete zdravljenje področje oziroma rano pri svojem ljubljenčku?

- Da
- Ne
- To naredi drug družinski član

Ali ste dobili zadostne informacije za samostojno oskrbo zdravljenega področja oziroma rane?

- Da
- Ne
- Ne vem

Kaj bi vam lahko olajšalo oskrbo zdravljenega področja oziroma rane?

- Dodatni pisni material
- Dodatni slikovni material
- Dodatni video material
- Prikaz oskrbe zdravljenega področja/rane s strani strokovnjaka

Ali bi se ponovno odločili za prejeto terapijo ne glede na finančne stroške?

- Da
- Ne
- Ne vem

Iskrena hvala za sodelovanje!

Priloga 4: Kratki test za lastnike živali

KRATKI TEST ZA LASTNIKE ŽIVALI

1) Vprašalnik izpolnjujem:

Pred prvim zdravljenjem svojega ljubljenčka V času rednega pregleda po zdravljenju

2) Ali po vašem mnenju Vprašalnik - HRQoL_{Slo} popolnoma zajema problematiko in je dovolj natančen?

Da

Prosim, razložite zakaj

Ne

Prosim, razložite zakaj

3) Kakšna je po vašem mnenju dolžina Vprašalnika - HRQoL_{Slo} ?

Ustrezno dolg

Predolg

Prekratek

4) Kako bi ocenili enostavnost Vprašalnika - HRQoL_{Slo} glede razumljivosti vprašanj in ponujenih odgovorov?

Zelo enostavno Ponekod enostavno Ne zelo enostavno Sploh ne enostavno

5) Ali so po vašem mnenju vprašanja praktično zastavljena?

Zelo praktično Ponekod praktično Ne zelo praktično Na sploh nepraktično

6) Ali po vašem mnenju Vprašalnik - HRQoL_{Slo} odraža kakovost življenja vašega ljubljenčka?

Da

Prosim, razložite zakaj

Ne

Prosim, razložite zakaj

7) Ali se ob izpolnjevanju Vprašalnika - HRQoL_{Slo} počutite bolj vpete v trenutno zdravljenje svojega ljubljenčka?

Da

Prosim, razložite zakaj

Ne

Prosim, razložite zakaj

Prosim, navedite kakršen koli predlog glede izbrisala/dodajanja vprašanj/a ali glede spremembe česar koli v Vprašalniku - HRQoL_{Slo}:

Hvala!

Priloga 5: Farmakokinetični parametri BLM v krvi psov

Št. pacienta	Vd (ml/kg)	t _{1/2} (min)	CL (ml/min/kg)	CL (ml/min/m ²)	k _{el} (min ⁻¹)
1	125,01	22,65	3,83	114,87	0,031
2	114,86	26,6	3,01	87,15	0,026
3	150,29	17,15	6,07	202,08	0,04
4	126,42	17,02	5,15	138,37	0,041
5	210,67	26,1	5,5	166,15	0,027
6	190,69	22,73	5,81	142,62	0,03
7	267,83	23,39	7,94	179,36	0,03
8	155,67	24,86	4,43	101,72	0,028
9	301,44	21,67	9,64	212,08	0,03199
10	207,34	20,73	6,93	202,17	0,03343
11	150,76	17,57	5,95	196,38	0,03945
12	348,37	19,99	12,08	287,66	0,03468
13	255,08	23,69	9,64	265,81	0,02926
14	133,70	16,03	5,78	190,31	0,04325
15	326,21	31,0	7,29	228,79	0,02236
16	217,58	16,36	9,22	289,17	0,04236
17	256,39	24,23	7,30	260,81	0,0286
18	376,12	30,54	8,53	220,52	0,02269
19	216,50	22,60	6,64	212,59	0,03066
20	265,93	20,72	8,89	287,45	0,03345
21	215,96	19,51	7,67	239,86	0,03553
22	250,72	17,16	8,31	177,14	0,0404
23	300,03	24,48	8,49	195,59	0,02832

Vd-porazdelitveni volumen, t_{1/2}-razpolovni čas, CL-očistek

Vd-volume of distribution, t_{1/2}-elimination half-time, CL-clearance

Priloga 6: Odstotek T_{reg} v krvi psov tekom zdravljenja

Št. pacienta	Vrsta tumorja	Odgovor na zdravljenje	% T_{reg}		
			Pred zdravljenjem	4 tedne po zdravjenju	Ob koncu opazovalnega obdobja
1	OM	PD	1,3	0,5	0,3
2	MCT	PR	1,3	1,4	0,4
3	CP	CR	0,7	0,7	0,3
4	MCT	CR	1,6	1,5	0,9
5	MCT	CR	8,0	1,8	0,3
6	CP	CR	0,7	0,4	0,2
7	OM	PD	1,1	2,2	0,8
8	OM	PD	8,1	10,2	1,6
9	OM	PD	1,1	0,7	0,2
10	OM	PD	0,4	0,5	0,3
11	OM	PD	2,4	1,9	0,3
12	OM	CR	2,9	0,8	0,5
13	MCT	CR	2,7	2,0	0,3
14	OM	PD	3,7	2,8	0,6
15	MCT	CR	0,5	0,8	0,8
16	OM	PD	1,1	1,2	0,3
17	MCT	CR	0,3	0,8	0,3
18	MCT	PD	7,5	4,2	0,5
19	MCT	CR	4,5	0,8	1,1
20	MCT	PD	1,6	1,4	0,9
21	MCT	CR	0,9	0,5	0,6
22	MCT	CR	0,6	1,3	0,3
23	MCT	CR	0,6	0,4	0,3
24	MCT	CR	1,5	1,0	0,4
25	MCT	CR	0,7	0,6	0,6

26	MCT	CR	1,6	0,4	0,7
27	MCT	CR	0,5	0,3	0,5
28	MCT	CR	1,9	1,3	0,9
29	OM	PD	1,0	0,2	1,5

OM-oralni melanom, MCT-mastocitom, CP-kožni plazmacitom, T_{reg}-regulatorni limfociti T, CR-popolni odgovor; PR-delni odgovor, PD-napredovala bolezen

OM-oral melanoma, MCT-mast cell tumour, CP-cutaneous plasmacytoma, T_{reg}-regulatory T cells, CR-complete response, PR-partial response, PD-progressive disease

Priloga 7: Izražanje PD-1 in PD-L1 v tumorjih psov

Št. pacienta	Vrsta tumorja	Odgovor*	Čas opazovanja (meseci)	PFS (meseci)	Izražanje PD-1	Izražanje PD-L1
1	MCT	CR	12 (NR)	12	0	4,8
2	MCT	CR	23	23	4,6	5,8
3	MCT	CR	31	15	3,8	3,7
4	MCT	CR	62	62	3	4,4
5	MCT	PD	2	2	5	6
6	MCT	CR	45	45	0,8	1,2
7	MCT	CR	32	5	6,3	5,6
8	MCT	CR	32	2	4,8	5,1
9	MCT	CR	33 (NR)	17	3,4	6,3
10	MCT	CR	53	53	3,8	1,6
11	MCT	CR	11 (NR)	2	3,1	3,7
12	MCT	CR	61	61	5,5	4,4
13	MCT	CR	39	39	2,9	4,2
14	MCT	CR	25 (NR)	25	5	6,4
15	MCT	CR	40	40	2,8	4,9
16	MCT	PD	7	7	6	6,8
17	MCT	CR	28	28	3,8	5,6
18	MCT	CR	50	3	5,2	6,8
19	MCT	CR	24	24	2,4	4,5
20	MCT	CR	27	25	4,9	6,6
21	MCT	CR	28	25	6	4,7
22	OM	PD	2	0	5,5	5
23	OM	PD	9 (NR)	2	5	5
24	OM	PD	5	1	6,1	6,1
25	OM	PD	13 (NR)	13	5,5	5,2
26	OM	PD	3	2	5,2	5,8

27	OM	PD	10	1	5,8	5,4
28	OM	PD	22 (NR)	5	1	5,8
29	OM	CR	9 (NR)	8	4,7	5,1
30	OM	PD	5	1	4,6	5,8

*-ob koncu opazovalnega obdobja, MCT-mastocitom, OM-oralni melanom, CR-popolni odgovor, PD-napredovala bolezen, NR-evtanazija/pogin zaradi vzroka, nepovezanega s tumorjem, PFS-preživetje brez napredovanja bolezni, PD-1-receptor programirane celične smrti 1, PD-L1-ligand 1 za receptor programirane celične smrti 1

*-at the end of observation period, MCT-mast cell tumour, OM-oral melanoma, CR-complete response, PD-progressive disease, NR-death/euthanasia due to non tumour-related reason, PFS-progression-free survival, PD-1-programmed cell death-1, PD-L1-programmed cell death-1 ligand 1

Priloga 8: Razdelitev psov glede na izražanje PD-1 v tumorjih

Skupina	Št.	Vrsta tumorja	Odgovor*	Čas opazovanja (meseci)	PFS (meseci)	Izražanje PD-1
Nizko izražanje PD-1	1	MCT	CR	12 (NR)	12	0
	2	MCT	CR	23	23	4,6
	3	MCT	CR	31	15	3,8
	4	MCT	CR	62	62	3
	6	MCT	CR	45	45	0,8
	8	MCT	CR	32	2	4,3
	9	MCT	CR	33 (NR)	17	3,4
	10	MCT	CR	53	53	3,8
	11	MCT	CR	11 (NR)	2	3,1
	13	MCT	CR	39	39	2,9
	15	MCT	CR	40	40	2,8
	17	MCT	CR	28	28	3,8
	19	MCT	CR	24	24	2,4
	20	MCT	CR	27	25	4,9
	28	OM	PD	22 (NR)	5	1
Visoko izražanje PD-1	29	OM	CR	9 (NR)	8	4,7
	30	OM	PD	5	1	4,6
	5	MCT	PD	2	2	5
	7	MCT	CR	32	5	6,3
	12	MCT	CR	61	61	5,5
	14	MCT	CR	25 (NR)	25	5
	16	MCT	PD	7	7	6
	18	MCT	CR	50	3	5,2
	21	MCT	CR	28	25	6
	22	OM	PD	2	0	5,5
	23	OM	PD	9 (NR)	2	5
	24	OM	PD	5	1	6,1

	25	OM	PD	13 (NR)	13	5,5
	26	OM	PD	3	2	5,2
	27	OM	PD	10	1	5,8

*-ob koncu opazovalnega obdobja, MCT-mastocitom, OM-oralni melanom, CR-popolni odgovor, PD-napredovala bolezen, NR-evtanazija/pogin zaradi vzroka, nepovezanega s tumorjem, PFS-preživetje brez napredovanja bolezni, PD-1-receptor programirane celične smrti 1

*-at the end of observation period, MCT-mast cell tumour, OM-oral melanoma, CR-complete response, PD-progressive disease, NR-death/euthanasia due to non tumour-related reason, PFS-progression-free survival, PD-1-programmed cell death-1

Priloga 9: Razdelitev psov glede na izražanje PD-L1 v tumorjih

Skupina	Št.	Vrsta tumorja	Odgovor*	Čas opazovanja (meseci)	PFS (meseci)	Izražanje PD-L1
Nizko izražanje PD-L1	1	MCT	CR	12 (NR)	12	4,8
	3	MCT	CR	31	15	3,7
	4	MCT	CR	62	62	4,4
	6	MCT	CR	45	45	1,2
	10	MCT	CR	53	53	1,6
	11	MCT	CR	11 (NR)	2	3,7
	12	MCT	CR	61	61	4,4
	13	MCT	CR	39	39	4,2
	15	MCT	CR	40	40	4,9
	19	MCT	CR	24	24	4,5
	21	MCT	CR	28	25	4,7
Visoko izražanje PD-L1	2	MCT	CR	23	23	5,8
	5	MCT	PD	2	2	6
	7	MCT	CR	32	5	5,6
	8	MCT	CR	32	2	5,1
	9	MCT	CR	33 (NR)	17	6,3
	14	MCT	CR	25 (NR)	25	6,4
	16	MCT	PD	7	7	6,8
	17	MCT	CR	28	28	5,6
	18	MCT	CR	50	3	6,8
	20	MCT	CR	27	25	6,6
	22	OM	PD	2	0	5
	23	OM	PD	9 (NR)	2	5
	24	OM	PD	5	1	6,1
	25	OM	PD	13 (NR)	13	5,2
	26	OM	PD	3	2	5,8
	27	OM	PD	10	1	5,4

	28	OM	PD	22 (NR)	5	5,8
	29	OM	CR	9 (NR)	8	5,1
	30	OM	PD	5	1	5,8

*-ob koncu opazovalnega obdobja, MCT-mastocitom, OM-oralni melanom, CR-popolni odgovor, PD-napredovala bolezen, NR-evtanazija/pogin zaradi vzroka, nepovezanega s tumorjem, PFS-preživetje brez napredovanja bolezni, PD-L1-ligand 1 za receptor programirane celične smrti 1

*-at the end of observation period, MCT-mast cell tumour, OM-oral melanoma, CR-complete response, PD-progressive disease, NR-death/euthanasia due to non tumour-related reason, PFS-progression-free survival, PD-L1- programmed cell death-1 ligand 1

Priloga 10: Odgovor na zdravljenje pri psih, vključenih v raziskavo HRQoL

Skupina	Št. pacienta	Vrsta tumorja	V (cm³)	Zdravljenje	Odgovor na zdravljenje
Psi z objektivnim odgovorom na zdravljenje	1	FSA	0,2	EKT	CR
	2	STS	R	KRG+EKT	CR
	3	MCT	2,5	EKT+GEP	CR
	4	MCT	6,3	KRG+EKT+GEP	CR
	5	MCT	0,9	EKT+GEP	CR
	6	MCT	2,1	EKT+GEP	CR
	7	MCT	0,3	EKT+GEP	CR
	8	MCT	0,4	EKT+GEP	CR
	10	MCT	3,5	KRG+EKT+GEP	CR
	11	OM	3,1	KRG+GEP	CR
	12	MCT	0,8	EKT+GEP	CR
	13	MCT	1,1	EKT+GEP	CR
	15	MCT	12,6	EKT+GEP	CR
	16	MCT	R	GEP	CR
	17	OF	18,8	EKT+GEP	CR
	19	MCT	15,4	KRG+EKT+GEP	CR
	20	MCT	R	GEP	CR
	21	MCT	5,9	EKT+GEP	CR
	23	MCT	0,5	EKT+GEP	CR
	24	MCT	2,0	EKT+GEP	CR
	25	MCT	0,1	EKT+GEP	CR
	28	MCT	1,0	EKT+GEP	CR
	29	MCT	R	EKT+GEP	CR
	30	MCT	R	EKT+GEP	CR
	31	MCT	R	EKT+GEP	CR
	33	MCT	0,4	EKT+GEP	CR
	37	CP	5,5	KRG+EKT+GEP	CR

Psi, pri katerih je bolezen napredovala kljub zdravljenju	38	MCT	0,1	EKT+GEP	CR
	42	MCT	2,35	KRG+EKT+GEP	CR
	43	MCT	0,13	EKT+GEP	CR
	44	MCT	0,11	EKT+GEP	CR
	26	MCT	18,8	EKT+GEP	PR
	36	MCT	1,0	EKT+GEP	PR
	39	MPNST	23,0	EKT+GEP	PR
	40	MPNST	2,5	KRG+EKT+GEP	PR
	41	MCT	2,6	EKT+GEP	PR
	9	MCT	14,7	EKT+GEP	PD
	14	OM	40,1	KRG+EKT+ GEP	PD
	18	OM	R	KRG+GEP	PD
	22	HS	6,4	GEP	PD
	27	MCT	64,1	GEP	PD
	32	OF	27,8	KRG+EKT+GEP	PD
	34	SCC	9,8	KRG+EKT+GEP	PD
	35	OM	15,7	KRG+EKT+GEP	PD

FSA-fibrosarkom, STS-mehkotkvni sarkom, MCT-mastocitom, OM-oralni melanom, OF-oralni fibrosarkom,

CP-kožni plazmacitom, MPNST-maligni tumor ovojnici perifernih živcev, HS-histiocitni sarkom, SCC-

ploščatocelični karcinom, R-rezidualna bolezen, EKT-elektrokemoterapija, GEP-genski elektroprenos IL-12,

KRG-kirurško zdravljenje, CR-popolni odgovor, PR-delni odgovor, PD-napredovala bolezen

FSA-fibrosarcoma, STS-soft tissue sarcoma, MCT-mast cell tumour, OM-oral melanoma, OF-oral fibrosarcoma,

CP-cutaneous plasmacytoma, MPNST-malignant peripheral nerve sheath tumour, HS-histiocytic sarcoma, SCC-

squamous cell carcinoma, R-residual disease, EKT-electrochemotherapy, GEP-IL-12 gene electrotransfer, KRG-

surgery, CR-complete response, PR-partial response, PD-progressive disease

Priloga 11: Rezultati ocene splošnega zdravja psov, vključenih v raziskavo HRQoL

Sklop	Moj ljubljenček...	Min	Max	Povprečje	SD
Veselje	... je igrov.	2	5	4,5	0,9
	... odreagira na mojo bližino.	4	5	5,0	0,2
	... uživa življenje.	3	5	4,8	0,5
Duševno stanje	... ima večino dobrih dni.	3	5	4,7	0,6
	... večino časa spi.	1	5	2,8	1,4
	... se zdi zdolgočasen, depresiven, ni pozoren.	1	5	1,4	0,9
Bolečina	... ima bolečine.	1	5	1,9	1,2
	... je zasopihan, tudi ko miruje.	1	5	1,5	1,1
	... se občasno trese ali trepeta.	1	5	2,0	1,4
Apetit	... ima normalen apetit.	2	5	4,7	0,7
	... občasno bruha ali mu je slabo.	1	4	1,6	0,8
	... uživa priboljške/prigrizke.	1	5	4,3	1,2
Splošni videz	... se občasno ponečedi.	1	5	1,4	1,0
	... zaudarja po urinu ali ima nadraženo kožo.	1	3	1,1	0,3
	... ima mastno dlako in na splošno slab videz.	1	3	1,1	0,4
Hidracija	... zaužije zadostno količino tekočine.	4	5	4,9	0,3
	... ima občasne driske.	1	5	2,1	1,3
	... normalno urinira.	2	5	4,7	0,8
Mobilnost	... se giblje normalno.	2	5	4,5	0,9
	... večino dneva preleži kar na istem mestu.	1	5	1,8	1,2
	... je aktiven kot običajno.	1	5	4,3	1,1

Min-najnižja ocena, Max-najvišja ocena, SD-standardni odklon

Min-minimal score, Max-maximal score, SD-standard deviation

Priloga 12: Rezultati Kratkega testa o vprašalniku

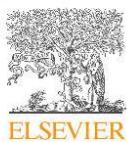
Vprašanje	Frekvenca	Odstotek	Veljavni odstotek
Vprašalnik izpolnjujem: <ul style="list-style-type: none">- Pred prvim zdravljenjem svojega ljubljenčka- Ob rednem pregledu po zdravljenju- Lastnik ni odgovoril	0 39 5	0 88,6 11,4	100,00
Ali po vašem mnenju vprašalnik popolnoma zajema problematiko in je dovolj natančen? <ul style="list-style-type: none">- Da- Ne- Lastnik ni odgovoril	29 13 2	65,9 29,5 4,5	69,0 31,0
Kakšna je po vašem mnenju dolžina vprašalnika? <ul style="list-style-type: none">- Ustrezno dolg- Predolg- Prekratek- Lastnik ni odgovoril	37 2 3 2	84,1 4,5 6,8 4,5	88,1 4,8 7,1
Kako bi ocenili enostavnost vprašalnika glede razumljivosti vprašanj in ponujenih odgovorov? <ul style="list-style-type: none">- Zelo enostavno- Ponekod enostavno- Ne zelo enostavno- Sploh ne enostavno- Lastnik ni odgovoril	30 9 1 1 3	68,2 20,5 2,3 2,3 6,8	73,2 22,0 2,4 2,4
Ali so po vašem mnenju vprašanja praktično zastavljena? <ul style="list-style-type: none">- Zelo praktično- Ponekod praktično- Ne zelo praktično- Nasploh nepraktično- Lastnik ni odgovoril	26 11 3 1 3	59,1 25,0 6,8 2,3 6,8	63,4 26,8 7,3 2,4
Ali po vašem mnenju vprašalnik odraža kakovost življenja vašega ljubljenčka? <ul style="list-style-type: none">- Da- Ne- Lastnik ni odgovoril	34 6 4	77,3 13,6 90,9	85,0 15,0
Ali se ob izpolnjevanju vprašalnika počutite bolj vpeti v trenutno zdravljenje svojega ljubljenčka?			

- Da	17	38,6	44,7
- Ne	21	47,7	55,3
- Lastnik ni odgovoril	6	13,6	

Priloga 13: Članek (Milevoj in sod., 2019)

Research in Veterinary Science 122 (2019) 40–49

Contents lists available at ScienceDirect



Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc



A combination of electrochemotherapy, gene electrotransfer of plasmid encoding canine IL-12 and cytoreductive surgery in the treatment of canine oral malignant melanoma



Nina Milevoj^a, Urša Lamprecht Tratar^b, Ana Nemec^{a,1}, Andreja Brožič^b, Katarina Žnidar^c, Gregor Serša^b, Maja Čemažar^{b,c}, Nataša Tozon^{a,*}

^a University of Ljubljana, Veterinary Faculty, Small Animal Clinic, Cesta v Mesni log 47, 1000 Ljubljana, Slovenia

^b Institute of Oncology Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenia

^c University of Primorska, Faculty of Health Sciences, Polje 42, 6310 Isola, Slovenia

ARTICLE INFO

Keywords:

Cytoreductive surgery
Dogs
Electrochemotherapy
Interleukin-12
Oral malignant melanoma
Regulatory T cells

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the safety and efficacy of the combination of electrochemotherapy (ECT) with bleomycin and gene electrotransfer (GET) of plasmid encoding canine interleukin 12 (IL-12) for the treatment of canine oral malignant melanoma (OMM). Our focus was to determine the effect of the treatment on achieving local tumor control and stimulation of an antitumor immune response. Nine dogs with histologically confirmed OMM stage I to III were included in a prospective, non-randomized study. The dogs were treated with a combination of cytoreductive surgery, ECT and IL-12 GET, which was repeated up to five times, depending on the clinical response to the treatment, evaluated according to the follow-up protocol (7, 14 and 28 days after the last treatment). One month after treatment, the objective response (OR) rate was 67% (6/9). Median survival time (MST) was 6 months and, even though the disease progressed in 8/9 patients at the end of the observation period (2 to 22 months), four animals were euthanized due to tumor-unrelated reasons. In addition, we observed a decline in the percentage of regulatory T cells (T_{reg}) in the peripheral blood in the course of the treatment, which could be attributed to a systemic antitumor response to IL-12 GET. The results of this study suggest that a combination of ECT and IL-12 GET may be beneficial for dogs with OMM, especially when other treatment approaches are not acceptable due to their invasiveness or cost.

1. Introduction

Oral malignant melanoma (OMM) is the most common malignancy of the oral cavity in older dogs (Ramos-Vara et al., 2000), with a high rate of invasion into surrounding bone and metastasis (Ramos-Vara et al., 2000; Withrow and MacEwen, 2013).

Dogs with untreated OMM have a median survival time (MST) of 2 months (Harvey et al., 1981). MST for surgically excised OMM ranges from 3 to 17 months, depending on the clinical stage of the tumor (Grosenbaugh et al., 2011; MacEwen et al., 1986; Owen, 1980; Sarowitz et al., 2017). In cases of non-resectable or incompletely excised tumors, alternative and/or adjuvant therapies are warranted, mostly radiotherapy (Proulx et al., 2003) or possibly a combination of radiotherapy and chemotherapy (Cancedda et al., 2016; Freeman et al., 2003). Because of the high metastatic potential of the tumor, there is a need for

an efficient systemic treatment; the effect of chemotherapy was evaluated in several studies, but its' use as a sole treatment is not recommended (Boria et al., 2004; Boston et al., 2014; Brockley et al., 2013; Dank et al., 2014; Rassnick et al., 2001; Tuohy et al., 2014). As OMM is considered highly immunogenic, many immunotherapeutic modalities with some effect on increasing the MST have been implemented for its treatment (Bianco et al., 2003; Boston et al., 2014; Dow et al., 1998; Finocchiaro and Glikin, 2012; Grosenbaugh et al., 2011; McLean and Lobetti, 2015; Ottino et al., 2013; Riccardo et al., 2014; Thamm et al., 2010). One of the main features of malignant cells is immune evasion, which is the result of the secretion of cytokines (e.g., interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor-β (TGF-β)) in the tumor microenvironment by tumor cells themselves and regulatory T cells (T_{reg}) (Atherton et al., 2016).

A significant increase in the percentage of T_{reg} was found in the

* Corresponding author.

E-mail address: nataša.tozon@vf.uni-lj.si (N. Tozon).

¹ Current address: Animal Hospital Postojna, Cesta v Staro vas 20, 6230 Postojna, Slovenia.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.11.001>

Received 16 August 2018; Received in revised form 15 October 2018; Accepted 11 November 2018

0034-5288/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

peripheral blood of dogs with OMM compared to healthy dogs (Atherton et al., 2016; Tominaga et al., 2010), and this increase correlated with the clinical stage of the tumor (Horiuchi et al., 2010).

One of the emerging treatments in veterinary oncology is electro-chemotherapy (ECT) (Impellizeri et al., 2016; Kodre et al., 2009; Maglietti et al., 2017; Spugnini et al., 2013; Tamzali et al., 2012; Tozon et al., 2016; Tozon et al., 2014) which disrupts the tumor cells locally, but has yet no proven effect on distant metastases when used as a sole treatment (Hepp et al., 2016; Sersa et al., 2015).

Gene electrotransfer of plasmid encoding interleukin 12 (IL-12 GET) is an efficient method for tumor control (Cemazar et al., 2017; Cutrera et al., 2015; Reed et al., 2010), especially when the plasmid is injected intratumorally (Pavlin et al., 2009). IL-12 activates primarily NK cells and T lymphocytes. Moreover, IL-12 increases the secretion of IFN-γ from activated T cells, which causes an increase in the production of IL-12 from antigen presenting cells (Colombo and Trinchieri, 2002). ECT combined with IL-12 GET was already used in two dogs with OMM in which a stable disease (Cutrera et al., 2015) or momentarily reduced tumor volume was obtained (Reed et al., 2010). However, an evaluation of this approach in a larger cohort of dogs with OMM has not been performed yet. Therefore, the aim of this study was to evaluate the safety and efficacy of the combination of ECT and IL-12 GET in dogs with OMM. For this purpose, we analyzed the tumor response, local and systemic toxicity and immune response by measuring lymphocyte subpopulations in the peripheral blood.

2. Materials and methods

2.1. Animals and tumors

Nine dogs with histologically confirmed OMM between March 2016 and April 2018 were included in this study (Table 1). Animals were included when the owners declined standard treatment (surgery and/or radiotherapy) and gave a written consent for participation in the clinical study. All animals were in good general health and had basic hematology and biochemistry profiles within the reference limits. Before the treatment, staging was performed according to the WHO staging criteria (Owen, 1980), along with a physical examination, basic bloodwork, an examination of three-view thoracic radiographs (AXIOM Icons R100, Siemens healthcare, Erlangen, Germany) and abdominal ultrasonography (Logiq S7 Pro, GE Healthcare, Solingen, Germany). Fine-needle aspiration biopsy with subsequent cytological evaluation was performed in four patients with enlarged mandibular lymph nodes. Basic bloodwork consisted of a complete blood count with a differential white blood cell count, which was performed using an automated laser hematology analyzer with species-specific software (Advia 120, Siemens, Munich, Germany). The automated chemistry analyzer RX-Daytona (Randox, Crumlin, UK) was used to measure the following biochemical parameters: blood urea nitrogen (BUN), creatinine, alkaline

phosphatase (ALP) and alanine aminotransferase (ALT). Incisional or excisional biopsies collected for histopathology were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 4 µm thickness and stained with hematoxylin and eosin. At the histopathological examination all OMM samples were specifically assessed for the following characteristics: level of infiltration/invasion, nuclear atypia, mitotic index, the presence of lymphatic invasion, the presence of necrosis and lymphocytic/mononuclear infiltrates, according to malignancy criteria for melanocytic neoplasms (Millanta et al., 2002). Completeness of the excision was assessed in all excisional biopsy samples. The results of the histopathological examination are presented in Table 2.

The tumor location was determined as caudal when the tumor was caudal to the third premolar tooth, or rostral when it was rostral to the third premolar tooth (Verstraete and Lommer, 2012). Furthermore, tumors were described as either mucosal or gingival (if arising from the dentate jaws).

Each nodule was measured in three perpendicular directions (a, b, and c) and the tumor volume calculated using the following formula: $V = a \times b \times c \times \pi \div 6$.

2.2. Plasmid isolation

The pCMVcaIL-12 plasmid, encoding canine IL-12, was constructed in our previous study and thoroughly tested in *in vitro* and *in vivo* conditions (Lamprecht et al., 2015; Lamprecht Tratar et al., 2018). The plasmid was isolated using the Qiagen Endo-Free kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and was diluted to a concentration of 1 mg/ml in endotoxin-free water (Qiagen). Purified plasmid DNA was subjected to quality control and quantity determinations, which was performed by agarose gel electrophoresis and spectrophotometry.

2.3. Treatment protocol

Treatment was performed while the patients were under general anesthesia. The dogs were premedicated with an intravenous administration of midazolam (Midazolam Torrex, Torrex Pharma GesmbH, Vienna, Austria; 0.2 mg/kg), and general anesthesia was induced using propofol (Diprivan, Zeneca, Grangemouth, United Kingdom; 3–6 mg/kg) and maintained with isoflurane (Isoflurin, Vetpharma Animal Health, Barcelona, Spain) mixed within 100% oxygen. During anesthesia, the animals received Hartmann's solution (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) at a rate of 5 ml/kg/h. Dental charting, dental radiographs and periodontal treatment were performed, but any other oral/dental treatments (apart from tumor-related surgery) were postponed pending a response to the tumor-related treatment. First, patients underwent intracapsular excision of the tumor ("cytoreductive surgery"). After surgery, ECT was performed using an intravenous application of bleomycin (Blenoxane, Bristol-Myers, NY, USA). Bleomycin

Table 1
Patient data.

Patient No	Gender ^a	Breed	Age (years)	Tumor location	Clinical stage at the time of diagnosis ^b
1	FS	Cocker Spaniel	14	Mucosa, caudal	II
2	M	Shih Tzu	9	Mucosa, rostral	II
3	F	Jagdterrier	15	Gingiva, caudal	II
4	M	Soft Coated Wheaten Terrier	13	Gingiva, rostral	III
5	M	Golden Retriever	10	Gingiva, rostral	III
6	FS	Standard Poodle	9	Mucosa, rostral	I
7	FS	Bloodhound	9	Mucosa, caudal	I
8	M	Irish Setter	9	Gingiva, caudal	II
9	FS	Cavalier King Charles Spaniel	10	Mucosa, caudal	III

^a F: female, M: male, FS: spayed female, MC: castrated male.

^b WHO clinical staging system^c, Stage I: T1 N0 M0, Stage II: T2 N0 M0, Stage III: T2 N1 M0 or T3 N0 M0, Stage IV: Tn Nn M1.

^c T1: tumor ≤2 cm in diameter, T2: tumor 2–4 cm in diameter, T3: tumor > 4 cm in diameter, N0: no evidence of regional lymph node involvement, N1: histologic/cytologic evidence of regional lymph node involvement, N2: fixed nodes; M0: no evidence of distant metastasis, M1: evidence of distant metastasis.

Table 2
Histological characteristics of the tumors.

Patient N°	Biopsy type	Tumor thickness ^a (mm)	Nuclear atypia (0-3 ^b)	Mitotic index (per 10 HPF)	Lymphatic invasion (0/1 ^c)	Stromal invasion (0-1 ^d)	Necrosis (0-2 ^e)	Lymphocytic/mononuclear infiltrates (0-2 ^f)	Completeness of the excision (Yes/No)
1	Excisional	> 8	1	21	0	1	0	0	No
2	Incisional	> 7	2	34	0	1	0	0	NA ^g
3	Incisional	NA	1	35	0	1	1	2	NA
4	Incisional	NA	3	108	0	1	0	1	NA
5	Incisional	NA	1	29	0	1	0	1	NA
6	Incisional	NA	1	11	0	1	0	1	NA
7	Excisional	3	1	4	0	1	0	1	Yes
8	Excisional	10	2	53	0	1	0	2	Yes
9	Excisional	9	3	77	0	1	1	1	Yes

^a measured from the surface of the granular cell layer to the deepest location of neoplastic cells.

^b 0: no atypia, 1: mild atypia, 2: moderate atypia, 3: severe atypia.

^c 0: absence of lymphatic invasion, 1: presence of lymphatic invasion.

^d 0: absence of stromal invasion, 1: presence of stromal invasion.

^e 0: absence of necrosis, 1: moderate necrosis (limited necrotic areas), 2: extensive necrosis (diffusely within the tumor).

^f 0: absence of lymphocytic/mononuclear infiltrates, 1: moderate (lymphocytes and macrophages present sparsely in and around the tumor), 2: intense (lymphocytes and macrophages were present densely throughout the tumor).

^g NA: not assessed.



Fig. 1. Non-invasive MEA that was used for IL-12 GET (Kos et al., 2017).

was dissolved at a concentration of 3 mg/ml and administered intravenously at a dose of 0.3 mg/kg. Ten minutes after the intravenous injection of bleomycin, eight electric pulses were delivered (each of a 100 µs duration, an amplitude to electrode distance ratio of 1300 V/cm and a frequency of repetition of 5 kHz) with an electric pulse generator, Cliniporator™ (IGEA s.r.l., Carpi, Italy), using two parallel stainless-steel noninvasive plate electrodes 6 mm apart. Electric pulses were first delivered to the margins of the surgical area in order to reduce the blood flow and then continued in concentric circles to the center of the area. Noninvasive electrodes were used, because the tumor was surgically removed and only the surface of the surgical areas was treated.

Immediately after the first phase of the treatment, the second phase of the treatment procedure, IL-12 GET, was performed. The plasmid encoding canine IL-12 was injected submucosally in two sites close to the tumor in the direction closest to the draining lymph nodes. Based on our previous experience, the dose per patient used was 2 mg (Cemazar et al., 2017). Immediately after the injection of the plasmid, electric pulses were delivered using the aforementioned electric pulse generator and a multi-electrode array (MEA, Iskra Medical, Podnart, Slovenia). MEA electrodes proved highly efficient with minimal or no damage to skin in mice in preclinical studies (Kos et al., 2017; Fig. 1). The electrode consists of seven spring-loaded pins arranged in a hexagonal mesh and spaced 3.5 mm apart. During the treatment, a total of 24 electric pulses (two electric pulses between each electrode pair, 60 V, duration of 150 ms, frequency of 4 Hz) were delivered.

At the end of the procedure, all patients received a single intravenous application of carprofen (Rimadyl, Pfizer, NY, USA; 4 mg/kg). Patients were discharged from the hospital when they were fully recovered from anesthesia. All patients received chlorhexidine-based oral gel (Stomodine gel, ICF, Milan, Italy). In patients with a heavy tumor burden for which extensive necrosis was expected, and in those that developed leukocytosis with neutrophilia after treatment, a course of antibiotic treatment was introduced (amoxicillin with clavulanic acid; Clavaseptin, Vetoquinol, Lure Cedex, France; 20 mg/kg/12 h po) until the improvement of clinical signs and/or laboratory parameters was achieved.

2.4. Evaluation of treatment outcome and sample collections

Local and systemic treatment outcomes and possible side effects were evaluated at regular follow-up examinations at 7, 14 and 28 days and 2 months, 6 months and one year after treatment and then annually until the end of the observation period (20 April 2018). At each time point, a clinical examination of the patient, including measurements of the tumor and three-view thoracic radiographs were performed. Furthermore, before treatment and at each follow-up examination, blood samples were collected for complete blood count and flow cytometry.

The local response to treatment was evaluated by measurements of the tumor size. The response to the treatment was determined 4 weeks after the last treatment and at the end of the observation period, and it was determined as a complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD) or progressive disease (PD) according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) (Nguyen et al., 2015). Possible side effects were determined at each follow-up examination according to the Veterinary Cooperative Oncology Group toxicity scale (VCOG-CTCAE) (VCOG-CTCAE, 2016).

2.5. Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Blood samples were examined for the presence of different subpopulations of lymphocytes. Blood was drawn on the day of the treatment and 7 days and 4 weeks later. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using Ficoll-PaqueTM Plus (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden) and Septmate (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) tubes. Two ml EDTA blood was diluted with 2 ml phosphate-buffered saline (PBS) solution. The diluted blood was gently pipetted into the Septmate (STEMCELL Technologies Inc)

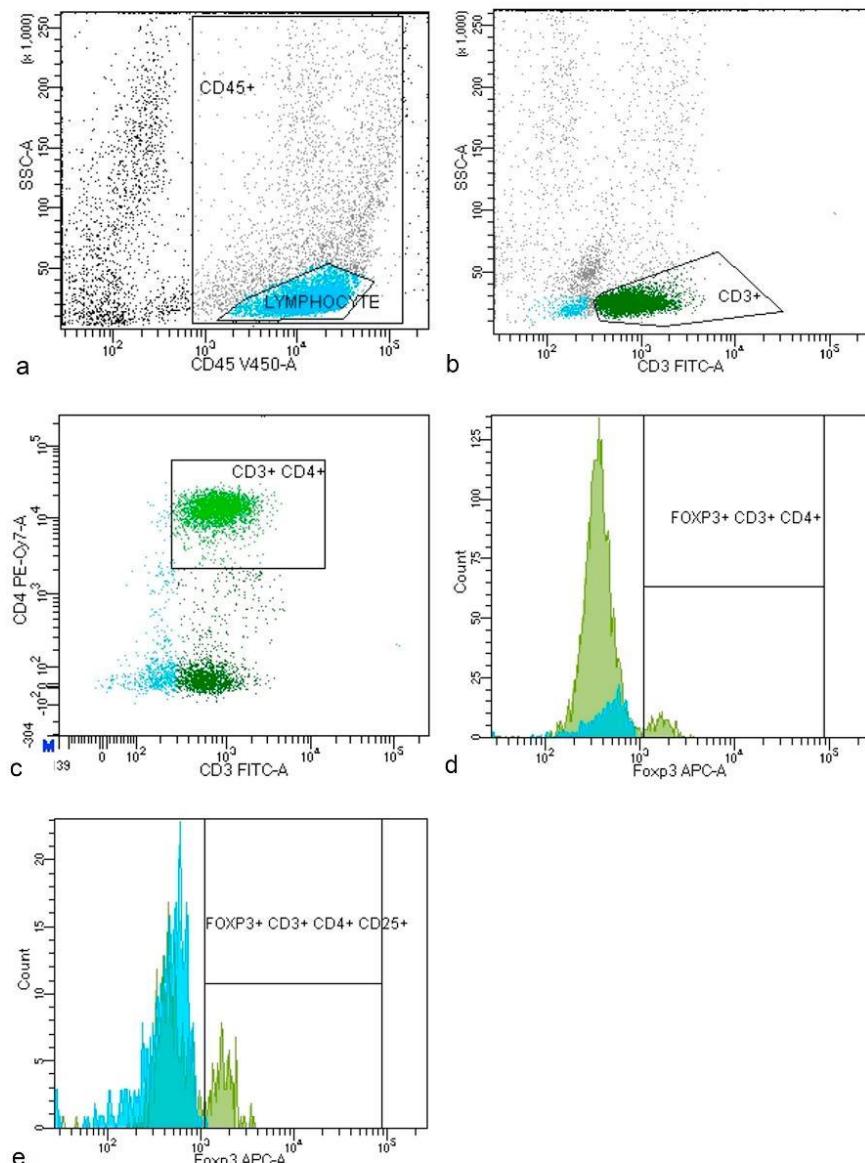


Fig. 2. Identification of lymphocyte populations by flow cytometry. a) Canine lymphocytes gating according to CD45 V450 (78%) intensity and side-scatter characteristics (SSC). b) Identification of T lymphocyte percentages using CD3 FITC intensity and side-scatter characteristics (86% (63%)). c) Identification of CD3+ and CD4+ (helper) T lymphocyte population (63%). d) Identification of FoxP3 cells within CD3+ and CD4+ lymphocyte populations (5,8%). e) Identification of FoxP3 cells within CD3+, CD4+ and CD25+ (regulatory T cells) lymphocyte populations (3,4%).

tubes, in which 4 ml Ficoll PaqueTM Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB) was pipetted beforehand. The samples were centrifuged for 10 min at 1200 rpm (Heraeus MULTIFUGE 1S-R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). The top layer consisting of PBMC was poured into a new tube and mixed with the same amount of PBS. The

samples were centrifuged for 5 min at 1500 rpm (Heraeus MULTIFUGE 1S-R centrifuge). The sediment containing the PBMC was mixed with 1 ml serum-free freezing media (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel) and stored in cryovials at -80°C . For the flow cytometry analysis, the cryovials containing PBMC were defrosted in a 37°C bath. The

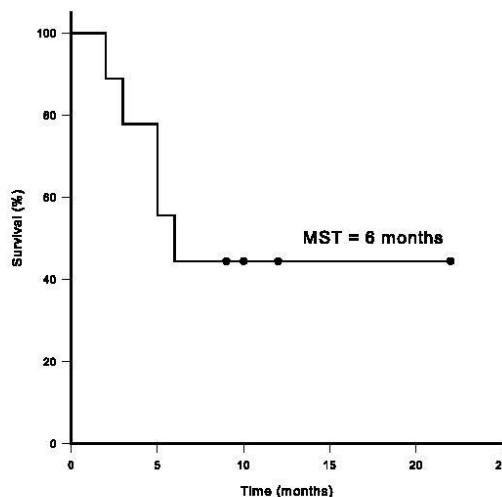


Fig. 3. Survival of dogs ($n = 9$) with oral malignant melanoma treated with a combination of cytoreductive surgery, ECT and IL-12 GET. The results are expressed using a Kaplan-Meier curve. Dots represent censored patients that were euthanized due to tumor-unrelated reasons.

content of the cryovials were mixed with 1 ml cold RPMI media and centrifuged for 5 min at 3000 rpm (Heraeus MULTIFUGE 1S-R centrifuge). The sediment was mixed with 12 ml RPMI media and put in the Petri dish for 2 h at 37 °C in order to restore the viability of the cells. After 2 h, the media containing the PBMC was centrifuged for 5 min at 1500 rpm (Heraeus MULTIFUGE 1S-R centrifuge). The PBMC of all nine patients were defrosted, but the PBMC for one patient (patient 8) were not used for the detection of cells with flow cytometry due to the poor viability of the cells in that patient.

2.6. Flow cytometry

To define the immunophenotype, the cell suspension was divided into three tubes to gate different lymphocyte subpopulations. The first tube was used to detect leukocytes (CD45+), the second to determine the percentage of B lymphocytes (CD21+) and T lymphocytes (CD3+), and the last tube to determine the percentage of helper (CD4+), cytotoxic (CD8+) and regulatory T cells (CD4 + CD25 + Foxp3+). The cells were stained with appropriate amounts (5 or 10 µl) of antibodies. The panel of antibodies used for surface staining included CD3 FITC (clone CA17.2A12) and CD21 PE (clone CA2.1D6) from Bio-Rad (California, USA) and CD45 eFluor® 450 (clone YKIX716.13), CD4 PE-Cy7 (clone YKIX302.9), CD8a eFluor 450 (clone YCAT55.9) and CD25 (clone P4A10) from eBioscience (MA, USA). After incubation in the dark for 20 min with surface antibodies, the cells were washed twice in PBS at 1500 rpm for 5 min (Hettich, Universal 32 centrifuge, Kirchlengern, Germany). The supernatant was discarded, and 300 µl cell fix (BD Biosciences, CA, USA) was added.

To detect the intracellular expression of canine Foxp3, the cells were fixed, permeabilized (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set Kit, eBioscience) and stained with the FOXP3 APC antibody (clone FJK-16s, eBioscience) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after surface staining, the cells were fixed in 1 ml freshly prepared fixation/permeabilization working solution for 90 min. Thereafter, the cells were washed twice with permeabilization buffer. FOXP3 APC

antibody and 100 µl permeabilization buffer were added, incubated in the dark for 45 min, and then washed twice with 2 ml permeabilization buffer (1500 rpm, 5 min Hettich, Universal 32 centrifuge). After incubation, 1.5 ml PBS was added to the sample, and the sample was mixed and centrifuged at 1500 rpm for 5 min (Hettich, Universal 32 centrifuge). The supernatant was discarded, and 200 µl PBS was added.

The samples were acquired using a ten-color flow cytometer, FACSCanto (BD Biosciences). During the sample acquisition, whole samples were measured. The measurement results were analyzed using BD FACSDiva software (v.8.0.1, BD Biosciences). For the results analysis, combined side-scatter (SSC) and the intensity of the CD45 surface marker gating was used for leukocyte gating (Fig. 2a). For the results analysis of the percentage of CD21 (B lymphocyte) and CD3 (T lymphocyte) (Fig. 2b), combined side-scatter (SSC) and surface marker (CD21/CD3) gating was used. We determined FoxP3+ cells from the percentage of FoxP3 cells within the total (Fig. 2c) CD4 (helper T cell) lymphocyte population (FoxP3+, CD3+, CD4+) (Fig. 2d) and within the CD25+ and CD4+ lymphocyte population (Fig. 2e).

2.7. Data analysis

All data were tested for normality of distribution with the Shapiro-Wilk test. When data were normally distributed, the differences between the experimental groups were statistically evaluated by one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by a Holm-Sidak test for multiple comparisons. When the normality test failed, Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks was used to compare the medians of our data. Non-normally distributed data were presented as the median and interquartile range (IQR), the range between the 1st (Q1) and 3rd (Q3) quartiles. A P value of < 0.05 was considered to be statistically significant. MST was calculated with Kaplan-Meier survival analysis, and dogs that were euthanized due to tumor-unrelated reasons were censored for analysis. SigmaPlot software (Systat Software, San Jose, CA, USA) was used for graphical representations and for the statistical analysis.

3. Results

3.1. Treatment results

Nine dogs with histologically confirmed OMM, with tumor stages ranging from I to III, were enrolled in our study. In four patients (patients 2, 5, 4 and 7) with enlarged mandibular nodes, fine-needle lymph node aspiration biopsy was performed, and there was no evidence of metastatic disease in any of the sampled nodes. The decision about the repetition of treatment was discussed continuously, depending on the response to treatment. One month after the last treatment, the objective response (OR) rate was 67% (6/9). At the end of the observation period (2 to 22 months, median: 6 months), PD occurred in all but one of the patients. The achieved MST was 6 months, and four patients were euthanized due to tumor-unrelated reasons and were censored for the statistical analysis (Fig. 3). The stage, location and recurrence of the tumors did not influence the MST. A summary of the treatment results is presented in Table 3. Importantly, in patient 4, after the fourth (last) treatment (week 8), radiographic evidence of new mandibular bone formation/mineralization was observed, which was consistent with the complete clinical response to the treatment. Thereafter, at 7 months posttreatment, the dog developed multiple lung metastases and was euthanized 10 months after initial presentation due to tumor-unrelated causes (development of a histologically different cutaneous tumor) (Fig. 4).

To evaluate the possible systemic effects of the treatment, the Veterinary Cooperative Oncology Group toxicity scale (VCOG-CTCAE) was followed at each post-treatment examination. No major side effects of the treatment were noted, and the treatment was well tolerated by all patients. Muscle contractions were observed at the time of application (Fig. 4).

Table 3
Treatment results.

Patient N°	Tumor volume (cm ³)	Previous treatment	I. session		II. Session		III. Session		IV. Session		V. Session		Response and tumor volume at the end of observational period (cm ³)	Survival time (months)		
			CS ^a	ECT/GET	Tumor volume (cm ³)	CS	ECT/GET	Tumor volume (cm ³)	CS	ECT/GET	Tumor volume (cm ³)	CS	ECT/GET			
1	3.14	/	+	-/+	0, two new tumors	+	+/+						CR (0)	CR (0)	9 (NR ^b)	
2	8.35	/	+	-/+	0,52 each necrosis	+	-/+	13.19	+	-/+	9.37	-	-/+	PD (pulmonary and abdominal metastases)	5	
3	12.56	/	-	+/+	4.19	+	+/+	0.79	+	-/+	0.46	-	-/+	PD (new tumor)	6	
45	15.7	/	+	+/+	12.56	+	+/+	0.52	+	+/+				CR (0)	3.14	
5	40.09	/	+	+/+	0.86	-	+/+						PR (14.13)	PD (pulmonary metastases)	10 (NR)	
6	0.79	incomplete resection	-	+/+	0.04	+	-/+	0.002	-	-/+			PR (14.19)	PD (suspected CNS metastases)	5	
7	0	incomplete resection	-	-/+	6.54	-	+/+	4.19	-	-/+			CR (0)	PD (local recurrence)	2	
8	14.13	incomplete resection	+	+/+	-								PR (4.19)	PD (pulmonary metastases)	22 (NR)	
9	1.31	incomplete resection	-	+/+									CR (0)	PD (local recurrence)	3	
													PD (lymph node metastasis)	12 (NR)		

^a CSCytoreductive surgery.

^b NRPatient was euthanized due to tumor-unrelated reasons and was censored for the statistical analysis.

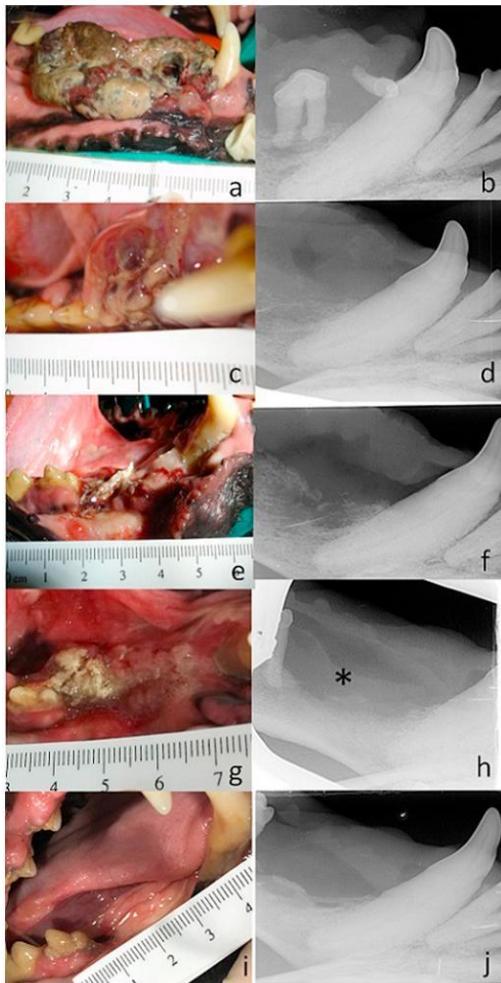


Fig. 4. Treatment response of a 13-year-old Soft-Coated Wheaten Terrier with stage III OMM (patient 4). After the fourth treatment (week 8), we observed radiographic evidence new mandibular bone formation/mineralization (*), which was consistent with the clinical response to the treatment. The dog had multiple lung metastases at 7 months posttreatment and was euthanized 10 months after initial presentation due to tumor-unrelated causes. Photos and dental radiographs were taken at the first treatment (week 0; a, b), second treatment (week 2; c, d), third treatment (week 4; e, f), fourth treatment (week 8; g, h) and at 9 months after the first treatment (i, j).

of electric pulses but disappeared at the end of pulse delivery. The intravenous application of bleomycin did not result in any local or systemic toxicity. The only local side effect of treatment was necrosis of the tumor, and in four patients (patients 3, 4, 5 and 8), transient leukocytosis with neutrophilia occurred, which was resolved with a short course of antibiotic treatment. After finishing treatment with ECT and GET, none of the patients suffered from a local or systemic infection.

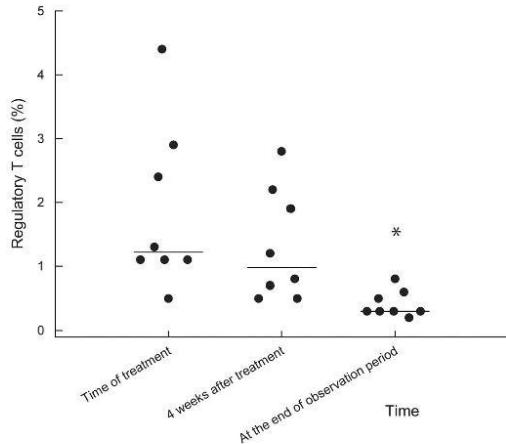


Fig. 5. Percentage of T_{reg} over the course of treatment. The percentage was measured by flow cytometry on the day of the treatment, at four weeks later and at the end of the observation period. The percentage of T_{reg} was significantly lower at the end of observation period compared to the percentage on the day of treatment. * $p < .05$.

3.2. Flow cytometry

There was no difference in the percentages of helper (CD4+) and cytotoxic T (CD8+) cells before and after the treatment, but there was a difference in percentages of T_{reg}. The results showed that the percentage of T_{reg} declined by the end of the observation period. At the time of treatment, the median percentage of T_{reg} was 1.2% (Q1: 1.1%, Q3: 2.8%). This number decreased to 1.0% after 4 weeks (Q1: 0.55%, Q3: 2.13%). At the end of the observation period, the percentage of T_{reg} was 0.3% (Q1: 0.3%, Q3: 0.58%). The results showed a statistically significant difference in percentages of T_{reg} before and after the treatment (Fig. 5).

4. Discussion

The results of our study demonstrate that the combination of ECT and IL-12 GET is a safe and effective treatment for local tumor control in dogs with OMM. Furthermore, we proved that the percentage of T_{reg} in the peripheral blood declined over the course of the treatment, which could be attributable to a systemic antitumor immune response.

There were three major limitations of this study. The first is the small sample size, which makes it impossible to draw clear conclusions about the survival times and significant differences between patients with different stages of OMM. The second limitation is that fine-needle aspiration biopsies were not performed in all of the patients but rather just in those with enlarged lymph nodes, while it has been described that lymph node size is not always a predictive factor for metastasis (Williams and Packer, 2003). However, the correlation between cytology and histopathology for staging of lymph nodes in dogs with oral melanocytic neoplasms was recently found to be poor (Grimes et al., 2017). The third limitation is the unavailability of advanced diagnostic techniques (i.e., CT, MRI scanning, etc.) at the time of staging of the patients. The latter two limitations may have caused an underestimation of the clinical stages of the patients.

Because of the malignant biologic behavior of the tumor and high rate of metastasis, OMM remains one of the most challenging tumors for veterinary oncologists. The most successful treatment method is radical

excision of the tumor, which frequently requires major maxillofacial surgical procedures, possibly resulting in impaired function and cosmesis (Arzi et al., 2015; Sarowitz et al., 2017). OMMs are considered highly immunogenic; therefore, many immunotherapeutic modalities for its treatment have been implemented. Several different agents, e.g., tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-2 (IL-2), *Corynebacterium parvum*, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), chondroitin sulfate proteoglycan-4 (CSPG4), liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidyl ethanolamine (L-MTP-PE) and suicide gene therapy combined with a vaccine composed of tumor cells extracts and xenogeneic cells producing human IL-2 and GM-CSF, were proven to induce an antitumoral immune response. The achieved MST was from 6 to 23 months, depending on the clinical stage of the disease (Bianco et al., 2003; Dow et al., 1998; MacEwen et al., 1999; MacEwen et al., 1986; Piras et al., 2017; Thamm et al., 2010), and not reached in one study (Finocchiaro and Glikin, 2012). A xenogenic human DNA-encoding tyrosinase protein vaccine (Oncept®, Merial®, Duluth, GA, U.S.A.) was developed for the adjuvant treatment of stage II to IV OMMs (Grosenbaugh et al., 2011). The vaccine prolonged the survival in two studies (MST of 29 months and not reached in another study) (Grosenbaugh et al., 2011; McLean and Lobetti, 2015), but did not prolong the survival time compared to dogs treated with surgery and/or radiotherapy in other studies (Boston et al., 2014; Ottendorf et al., 2013). ECT combined with IL-12 GET already proved to be a safe and efficient method for treating tumors. A pronounced and long-term antitumor effect was observed in mast cell tumors with 72% CR (median observation time: 40 months) (Cemazar et al., 2017), while on the histological level, an effective induction of a cellular response against neoplastic cells, characterized mainly by the recruitment of T-lymphocytes and macrophages and a fibrotic proliferation with reduction of microvessels, was seen (Salvadori et al., 2017). The same treatment was also already used in selected oral tumors, such as acanthomatous ameloblastoma and squamous cell carcinoma, in which ORs of 70% and up to 100% were achieved (Cutrera et al., 2015; Cutrera et al., 2008; Reed et al., 2010). However, these tumors are generally less locally aggressive and have a lower metastatic potential and, thus, carry a better prognosis than OMM (Withrow and MacEwen, 2013). The combination of ECT and IL-12 GET was attempted for the treatment of two OMMs where SD (Cutrera et al., 2015) or PR (Reed et al., 2010) was achieved. In our study, we achieved a 44% CR at four weeks after the treatment; however, in eight animals, the disease progressed at the end of the observation period. The achieved MST was 6 months, and in contrast with previously reported data, the clinical stage of the tumor did not influence the MST in our study. Interestingly, the three patients with stage III tumors all survived from 5 months to 12 months, and two of them were euthanized due to tumor-unrelated reasons. These achieved survival times are longer than the reported survival times for stage III tumors treated with radical surgical excision (MST: 3 months) (Withrow and MacEwen, 2013). We believe this finding might be attributable to the systemic effects of IL-12 GET, causing a delay in metastatic spread and boosting the antitumoral effects of the immune system. The histopathological characteristics of the tumors did not influence the MST and, therefore, are not presented in detail.

One of the main advantages of the combination of ECT and IL-12 GET is minimal trauma and therefore better immediate post-treatment function and cosmetic appearance when compared to major surgical procedures that are commonly indicated for the treatment of OMM. The treatment described here can also be performed on an outpatient basis and is repeated less frequently compared to hypofractionated radiation therapy currently recommended for OMM (Withrow and MacEwen, 2013). However, even though we managed to increase the overall survival of the animals and achieved good local control of the disease, we were unable to prevent the metastatic spread of the disease. Therefore, improvements of the treatment protocols and possible markers for the treatment planning are crucial for obtaining even better results of the treatment.

One of the proposed markers for the treatment planning is the percentage of T_{reg} cells in the peripheral blood (Sersa et al., 2015). The mechanism of action of these cells is based on eliciting different suppressive molecules, receptors and cells. Among other roles, the direct suppressive role is based also on the suppression of effector T lymphocytes activity that play a pivotal role in tumor elimination (Chaudhary and Elkord, 2016). The group of Tomonaga et al. (2010) showed that the percentage of T_{reg} in the peripheral blood of dogs with OMM was statistically significantly higher than in that of healthy dogs. In our study, the T_{reg} percentages were increased before the treatment and decreased in the following days after the treatment. At the end of the observation period, the percentage of T_{reg} evidently declined. This observation is in agreement with other studies in which the decline of T_{reg} after the immune treatment with IL-12 was observed (Zhao et al., 2012). The decline was also evident in the patients in which the disease progressed; therefore, the percentage of T_{reg} cannot serve as a prognostic marker, but our results demonstrated a negative impact of IL-12 on T_{reg} cells that are associated with a poor prognosis. One of the reasons the tumors progressed despite the decrease of T_{reg} could be that the tumors used different pathways of immune evasion that still need to be elucidated.

5. Conclusion

In conclusion, our results suggest that a combination treatment with ECT and IL-12 GET may be beneficial for dogs with OMM, as it prolongs the MST and is well tolerated by the animals. The achieved MST is comparable to the reported MST of animals treated with surgery and/or radiotherapy; therefore, the combined treatment is beneficial, especially in cases that would otherwise require major maxillofacial surgery or where radiotherapy is unavailable or poses a financial restraint to the owner. Additional studies to prove the clinical benefit of the combination treatment with ECT and IL-12 GET are warranted.

The manuscript was edited for language by "American Journal Experts".

Declaration of interest

None.

Funding

This work was supported by Slovenian Research Agency [grant numbers P3-0003, P4-0053, J3-6796]. Research was conducted in the scope of the EBAM European Associated Laboratory (LEA) and resulted from the networking efforts of the COST Action TD1104 (www.electroporation.net).

References

- Arzi, B., Cissell, D.D., Pollard, R.E., Verstraete, F.J.M., 2015. Regenerative approach to bilateral rostral mandibular reconstruction in a case series of dogs. *Front. Vet. Sci.* 2 (4). <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00004>.
- Atherton, M.J., Morris, J.S., McDermott, M.R., Lichten, B.D., 2016. Cancer immunology and canine malignant melanoma: a comparative review. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 169, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.11.003>.
- Bianco, S.R., Sun, J., Fosmire, S.P., Hance, K., Padilla, M.L., Ritt, M.G., Getzy, D.M., Duke, R.C., Withrow, S.J., Lana, S., Matthiesen, D.T., Dow, S.W., Bellgrau, D., Cutter, G.R., Helfand, S.C., Modiano, J.F., 2003. Enhancing antimelanoma immune responses through apoptosis. *Cancer Gene Ther.* 10, 726–736. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700625>.
- Boria, P.A., Murry, D.J., Bennett, P.F., Glickman, N.W., Snyder, P.W., Merkel, B.L., Schlitler, D.L., Mutsaers, A.J., Thomas, R.M., Knapp, D.W., 2004. Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224, 388–394. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.388>.
- Boston, S.E., Lu, X., Culp, W.T.N., Montinaro, V., Romanelli, G., Dudley, R.M., Liptak, J.M., Mestrinho, L. a., Buracco, P., 2014. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001–2012). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 245, 401–407. <https://doi.org/10.2460/>

- javma.245.4.401.
- Brockley, L.K., Cooper, M.A., Bennett, P.F., 2013. Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. *N. Z. Vet. J.* 61, 25–31. <https://doi.org/10.1080/00480169.2012.699433>.
- Cancedda, S., Rohrer Bley, C., Aresu, L., Dacasto, M., Leone, V.F., Pizzoni, S., Gracis, M., Marconato, L., 2016. Efficacy and side effects of radiation therapy in comparison with radiation therapy and temozolomide in the treatment of measurable canine malignant melanoma. *Vet. Comp. Oncol.* 14, e146–e157. <https://doi.org/10.1111/vco.12122>.
- Cemazar, M., Ambrozic Avgustin, J., Pavlin, D., Sersa, G., Poli, A., Krhak Levacic, A., Tesic, N., Lamprecht Tratar, U., Rak, M., Tozon, N., 2017. Efficacy and safety of electrochemotherapy combined with peritumoral IL-12 gene electrotransfer of canine mast cell tumours. *Vet. Comp. Oncol.* 15, 641–654. <https://doi.org/10.1111/vco.12208>.
- Chaudhary, B., Elkord, E., 2016. Regulatory T cells in the tumor microenvironment and cancer progression: Role and therapeutic targeting. *Vaccine* 4, 28. <https://doi.org/10.3390/vaccines4030028>.
- Colombo, M.P., Trinchieri, G., 2002. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 155–168.
- Cutrera, J., Torreiro, M.N., Shiomitsu, K., Mauldin, N., Li, S., 2008. Intratumoral bleomycin and IL-12 electrochemotherapy for treating head and neck tumors in dogs. *Methods Mol. Biol.* 423, 319–325.
- Cutrera, J., King, G., Jones, P., Kicenik, K., Gumpel, E., Xia, X., Li, S., 2015. Safe and effective treatment of spontaneous neoplasms with interleukin-12 electro-chemo-gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 19, 664–675. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12382>.
- Dank, G., Rassnick, K.M., Sokolovsky, Y., Garrett, L.D., Post, G.S., Kitchell, B.E., Sellon, R.K., Kleiter, M., Northrup, N., Segev, G., 2014. Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. *Vet. Comp. Oncol.* 12, 78–84. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00338.x>.
- Dow, S.W., Elmslie, R.E., Willson, A.P., Roche, L., Gorman, C., Potter, T.A., 1998. In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma. *J. Clin. Invest.* 101, 2406–2414. <https://doi.org/10.1172/JCI510>.
- Finocchiaro, L.M.B., Glikin, G.C., 2012. Cytokine-enhanced vaccine and suicide gene therapy as surgery adjuvant treatments for spontaneous canine melanoma: 9 years of follow-up. *Cancer Gene Ther.* 19, 852–861. <https://doi.org/10.1038/cgt.2012.72>.
- Freeman, K.P., Hahn, K.A., Harris, F.D., King, G.K., 2003. Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum based chemotherapy. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 96–101.
- Grimes, J.A., Matz, B.M., Christopher, P.W., Koehler, J.W., Cappelle, K.K., Hlusko, K.C., Smith, A., 2017. Agreement between cytology and histopathology for regional lymph node metastasis in dogs with melanocytic neoplasms. *Vet. Pathol.* 54, 579–587. <https://doi.org/10.1177/0300985817698209>.
- Grosenbaugh, D.A., Leard, A.T., Bergman, P.J., Klein, M.K., Meleo, K., Susaneck, S., Hess, P.R., Jankowski, M.K., Jones, P.D., Leibman, N.F., Johnson, M.H., Kurzman, I.D., Wolchok, J.D., 2011. Safety and efficacy of a xenogenic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *Am. J. Vet. Res.* 72, 1631–1638. <https://doi.org/10.2460/javr.72.12.1631>.
- Harvey, H.J., MacEwen, E.G., Braun, D., Patnaik, A.K., Withrow, S.J., Jongewaard, S., 1981. Prognostic criteria for dogs with oral melanoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178, 580–582.
- Hepp, M.V., Eigenthaler, T.K., Kähler, K.C., Herbst, R.A., Göppner, D., Gambichler, T., Ulrich, J., Dippel, E., 2016. Immune checkpoint blockade with concurrent electro-chemotherapy in advanced melanoma: a retrospective multicenter analysis American Joint Committee on Cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 951–959. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1856-z>.
- Horiuchi, Y., Tominaga, M., Ichikawa, M., Yamashita, M., Okano, K., Jikumaru, Y., Nariai, Y., Nakajima, Y., Kuwabara, M., Yukawa, M., 2010. Relationship between regulatory and type 1 T cells in dogs with oral malignant melanoma. *Microbiol. Immunol.* 54, 152–159. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00194.x>.
- Impellizeri, J., Auriacchio, L., Forde, P., Soden, D.M., 2016. Electroporation in veterinary oncology. *Vet. J.* 217, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.05.015>.
- Kodre, V., Cemazar, M., Pecar, J., Sersa, G., Cor, A., Tozon, N., 2009. Elektrochemoterapija compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. *In Vivo* 23, 55–62.
- Kos, S., Vanwarenberg, K., Dolinsek, T., Cemazar, M., Jelenc, J., Préat, V., Sersa, G., Vandermeulen, G., 2017. Gene electrotransfer into skin using noninvasive multi-electrode array for vaccination and wound healing. *Bioelectrochemistry* 114, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.12.002>.
- Lamprecht Tratar, U., Kos, S., Kamensek, U., Ota, M., Tozon, N., Sersa, G., Cemazar, M., 2018. Antitumor effect of antibiotic resistance gene-free plasmids encoding interleukin-12 in canine melanoma model. *Cancer Gene Ther.* 1–14. <https://doi.org/10.1088/s41417-018-0014-5>.
- Lamprecht, U., Kamensek, U., Stimač, M., Sersa, G., Tozon, N., Bosnjak, M., Brozic, A., de Sá Oliveira, G.G., Nakagawa, T., Šaečki, K., Cemazar, M., 2015. Gene electrotransfer of canine interleukin 12 into canine melanoma cell lines. *J. Membr. Biol.* 248, 909–917. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9800-2>.
- MacEwen, E.G., Patnaik, A., Harvey, H., Hayes, A., Matus, R., 1986. Canine oral melanoma: comparison of surgery versus surgery plus *Corynebacterium parvum*. *Cancer Investig.* 4, 397–402.
- MacEwen, E.G., Kurzman, I.D., Vail, D.M., Dubielzig, R.R., Everlith, K., Madewell, B.R., Rodriguez, C.O., Phillips, B., Zwahlen, C.H., Obradovich, J., Rosenthal, R.C., Fox, L.E., Rosenberg, M., Henry, C., Fidel, J., 1999. Adjuvant therapy for melanoma in dogs: results of randomized clinical trials using surgery, liposome-encapsulated muramyl tripeptide, and granulocyte colony-stimulating factor 1. *Clin. Cancer Res.* 5, 4249–4258.
- Maglietti, F., Tellado, M., Olai, N., Michinski, S., Marshall, G., 2017. Minimally invasive electrochemotherapy procedure for treating nasal duct tumors in dogs using a single needle electrode. *Radiol. Oncol.* 51, 422–430. <https://doi.org/10.1515/raon-2017-0043>.
- McLean, J.L., Lobetti, R.G., 2015. Use of the melanoma vaccine in 38 dogs: the south African experience. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 86, 1–4. <https://doi.org/10.4102/jsava.v86i1.1246>.
- Millanta, F., Fratini, F., Corazza, M., Castagnaro, M., Zappulli, V., Poli, A., 2002. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. *Res. Vet. Sci.* 73, 45–51. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00041-3).
- Nguyen, S.M., Thamm, D.H., Vail, D.M., London, C.A., 2015. Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet. Comp. Oncol.* 13, 176–183. <https://doi.org/10.1111/vco.12032>.
- Ottm, J.M., Smedley, R.C., Walshaw, R., Hauptman, J.G., Kiupel, M., Obadovich, J.E., 2013. A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Vet. Comp. Oncol.* 11, 219–229. <https://doi.org/10.1111/vco.12057>.
- Owen, L.N., 1980. TNM Classification of Tumours in Domestic Animals. World Health Organization.
- Pavlin, D., Čemařák, M., Kamenšek, U., Tozon, N., Pogačnik, A., Šerša, G., 2009. Local and systemic antitumor effect of intratumoral and peritumoral IL-12 electrogene therapy on murine sarcoma. *Cancer Biol. Ther.* 8, 2114–2122. <https://doi.org/10.4161/cbt.22974>.
- Piras, L.A., Riccardo, F., Iussich, S., Maniscalco, L., Gattino, F., Martano, M., Morello, E., Lorda Mayayo, S., Roib, V., Garavaglia, F., De Maria, R., Lardone, E., Collivignarelli, F., Mignaccia, D., Giacobino, D., Ferrone, S., Cavallo, F., Buracco, P., 2017. Prolongation of survival of dogs with oral malignant melanoma treated by en bloc surgical resection and adjuvant CSPG4-antigen electrovacination. *Vet. Comp. Oncol.* 15, 996–1013. <https://doi.org/10.1111/vco.12239>.
- Proulx, D., Rusland, D., Dodge, R., 2003. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. *Vet. Radiol. Ultrasound* 44, 352–359.
- Ramos-Vara, J.A., Beissenherz, M.E., Miller, M.A., Johnson, G.C., Pace, L.W., Fard, A., Kottler, S.J., 2000. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet. Pathol.* 37, 597–608. <https://doi.org/10.1354/vp.37-6-597>.
- Rassnick, K.M., Rusland, D.M., Cotter, S.M., Al-Sarraf, R., Bruyette, D.S., Gamblin, R.M., Meleo, K.A., Moore, A.S., 2001. Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989–2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 1444–1448. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.218.1444>.
- Reed, S.D., Fulmer, A., Buckholz, J., Zhang, B., Cutrera, J., Shiomitsu, K., Li, S., 2010. Bleomycin/interleukin-12 electrochemotherapy for treating naturally occurring spontaneous neoplasms in dogs. *Cancer Gene Ther.* 17, 571–578. <https://doi.org/10.1038/cgt.2010.13>.
- Riccardo, F., Iussich, S., Maniscalco, L., Mayayo, S.L., La Rosa, G., Arigoni, M., De Maria, R., Gattino, F., Lanzardo, S., Lardone, E., Martano, M., Morello, E., Prestiglio, S., Fiore, A., Quaglino, E., Zabarino, S., Ferrone, S., Buracco, P., Cavallo, F., 2014. CSPG4-specific immunity and survival prolongation in dogs with oral malignant melanoma immunized with human CSPG4 DNA. *Clin. Cancer Res.* 20, 3753–3762. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3042>.
- Salvadori, C., Svara, T., Rocchigiani, G., Millanta, F., Pavlin, D., Čemařák, M., Lamprecht Tratar, U., Sersa, G., Tozon, N., Poli, A., 2017. Effects of electrochemotherapy with cisplatin and peritumoral IL-12 gene electrotransfer on canine mast cell tumors: a histopathologic and immunohistochemical study. *Radiol. Oncol.* 51, 286–294. <https://doi.org/10.1515/raon-2017-0035>.
- Sarowitz, B.N., Davis, G.J., Kim, S., 2017. Outcome and prognostic factors following curative-intent surgery for oral tumours in dogs: 234 cases (2004 to 2014). *J. Small Anim. Pract.* 58, 146–153. <https://doi.org/10.1111/jsp.12624>.
- Sersa, G., Teissie, J., Čemařák, M., Signori, E., Kamenšek, U., Marshall, G., Miklavcic, D., 2015. Electrochemotherapy of tumors as in situ vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer Immunol. Immunother.* 64, 1315–1327. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1724-2>.
- Spugnini, E.P., Di Tosto, G., Salemmi, S., Peccia, L., Fanciulli, M., Baldi, A., 2013. Electrochemotherapy for the treatment of recurring aponeurotic fibromatosis in a dog. *Can. Vet. J.* 54, 606–609.
- Tamzali, Y., Borde, I., Rols, M.P., Golzio, M., Lyazhhi, F., Teissie, J., 2012. Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: a retrospective study of 48 cases. *Equine Vet. J.* 44, 214–220. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00425.x>.
- Thamm, D.H., Kurzman, I.D., Clark, M.A., Ehrhart, E.J., Kraft, S.L., Gustafson, D.L., Vail, D.M., 2010. Preliminary investigation of PEGylated tumor necrosis factor α in dogs with spontaneous tumors: phase I evaluation. *Clin. Cancer Res.* 16, 1498–1508. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2804>.
- Tominaga, M., Horiuchi, Y., Ichikawa, M., Yamashita, M., Okano, K., Jikumaru, Y., Nariai, Y., Kadouswa, T., 2010. Flow cytometric analysis of peripheral blood and tumor-infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 438–441.
- Tozon, N., Pavlin, D., Sersa, G., Dolinsek, T., Cemazar, M., 2014. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin injection: an observational study in superficial squamous cell carcinoma in cats. *J. Feline Med. Surg.* 16, 291–299. <https://doi.org/10.1177/1098612X13507071>.
- Tozon, N., Kramarić, P., Kos Kadunc, V., Sersa, G., Cemazar, M., 2016. Electrochemotherapy as a single or adjuvant treatment to surgery of cutaneous

- sarcoid tumours in horses: a 31-case retrospective study. *Vet. Rec.* 179, 1–6. <https://doi.org/10.1136/vr.103867>.
- Tuohy, J.L., Selmic, L.E., Worley, D.R., Ehrhart, N.P., Withrow, S.J., 2014. Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998–2011). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 245, 1266–1273. <https://doi.org/10.2460/javma.245.11.1266>.
- Verstraete, F., Lommer, M.J., 2012. *Oral and Maxillofacial Surgery in Dogs and Cats*, 1st ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Veterinary cooperative oncology group, 2016. Common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. *Vet. Comp. Oncol.* 14, 417–446. <https://doi.org/10.1111/vco.283>.
- Williams, L.E., Packer, R.A., 2003. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987–2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222, 1234–1236. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.1234>.
- Withrow, S., MacEwen, E., 2013. *Small Animal Clinical Oncology*, 4th ed. Elsevier, St. Louis, MO.
- Zhao, J., Zhao, J., Perlman, S., 2012. Differential effects of IL-12 on Tregs and non-Treg T cells: Roles of IFN- γ , IL-2 and IL-2R. *PLoS One* 7, e46241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046241>.

Priloga 14: Članek (Milevoj in sod., 2020)

DOI: 10.1002/vms3.232

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Health-related quality of life in dogs treated with electrochemotherapy and/or interleukin-12 gene electrotransfer

Nina Milevoj¹ | Natasa Tozon¹ | Sabina Licens² | Ursula Lamprecht Tratar³ |
Gregor Sersa³ | Maja Cemazar^{2,3}

¹Veterinary Faculty, Small Animal Clinic,
University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

²Faculty of Health Sciences, University of
Primorska, Isola, Slovenia

³Institute of Oncology Ljubljana, Ljubljana,
Slovenia

Correspondence

Maja Cemazar, Institute of Oncology
Ljubljana, Ljubljana, Slovenia.
Email: m.cemazar@onko-i.si

Funding information

Javna Agencija za Raziskovalno Dejavnost
RS, Grant/Award Number: J3-6796, P3-
0003 and P4-0053

Abstract

The aim of this study was to evaluate the owners' perception of health-related quality of life (HRQoL) of dogs after treatment with electrochemotherapy (ECT) alone or combined with interleukin-12 gene electrotransfer (IL-12 GET) and/or surgery. The owners of 44 dogs with histologically different tumours were offered the »Cancer Treatment Form« at least one month after treatment. The owners assessed their dogs' quality of life (QoL) after treatment as good (mean 7.4) (from 1-very poor to 10-excellent) and the general health compared with the initial diagnosis of cancer as improving (mean 3.9) (from 1-worse to 5-better). The assessment of the current QoL was better within the group of dogs treated with non-invasive treatment (ECT and/or IL-12 GET only), compared with those that received invasive treatment, where, in addition to ECT and/or IL-12 GET, surgery was performed ($p < .05$). The owners of dogs that achieved an objective response (OR) to the treatment assessed the QoL as significantly better compared with those whose dogs did not respond to the treatment ($p < .05$). The majority of the owners (86.4%) would opt for the therapy again, regardless of the financial costs. In conclusion, the results of this study demonstrate that the majority of the owners of dogs assessed their dogs' QoL as good and felt that it improved after the treatment, especially in dogs, treated with non-invasive treatment and in those that responded to the treatment. This supports further use of ECT and IL-12 GET as suitable methods for the treatment of selected tumours in veterinary medicine.

KEY WORDS

dogs, electrochemotherapy, gene electrotransfer, health-related quality of life, interleukin-12

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Veterinary Medicine and Science* Published by John Wiley & Sons Ltd

1 | INTRODUCTION

There is no general consensus on the definition of quality of life (QoL) in veterinary medicine (Belshaw & Yeates, 2018). It has many different proposed definitions, but broadly represents the aspects of an animal's life that make life better or worse for that specific animal (Belshaw & Yeates, 2018). Health-related quality of life (HRQoL) is a narrower term, defining the specific effect of a medical condition on an individual's health (Cella, 1992). In oncology, HRQoL defines the effect of cancer and its treatment on body function and well-being (Lynch, Savary-Bataille, Leeuw, & Argyle, 2011). Information about HRQoL can help making treatment decisions, provide prognostic information, improve owner-veterinarian interaction and evaluate the impact of new treatments in clinical trials (Lynch et al., 2011; Bottomley et al., 2005).

In human medicine, QoL is considered one of the main goals and an important decision-making factor in clinical trials and cancer treatment. However, in veterinary medicine, this field has only begun to gain importance in the past two decades. Several questionnaires have been proposed for assessing QoL of dogs with chronic pain (Belshaw & Yeates, 2018), neurological and musculoskeletal pain (Silva, Luna, Joaquim, Coutinho, & Possebon, 2017), spinal cord injuries (Budke et al., 2008), cardiac disease (Freeman, Rush, Farabaugh, & Must, 2005; Oyama et al., 2008), obesity (Yam et al., 2016), diabetes mellitus (Niessen et al., 2012), epilepsy (Packer & Volk, 2015; Wessmann, Volk, Packer, Ortega, & Anderson, 2016), skin disease (Noli et al., 2011; Noli, Minafò, & Galzerano, 2011), portosystemic shunt (Greenhalgh et al., 2014) and in cats with chronic kidney disease (Bijlsmans, Jepson, Syme, Elliott, & Niessen, 2016), cardiac disease (Freeman et al., 2012; Reynolds et al., 2010) and skin disease (Noli, Borio, Varina, & Schievano, 2016). In veterinary oncology, QoL was evaluated in dogs with mammary tumors (Faustino & Lallo, 2015) and in animals with different types of tumors (Lynch et al., 2011), treated with chemotherapy (Iliopoulos, Kitchell, & Yuzbasian-Gurkan, 2013; Mellanby, Herrtage, & Dobson, 2003; Thornton, Cave, Bridges, & Stell, 2018; Tzannes, Hammond, Murphy, Sparkes, & Blackwood, 2008; Vøls, Heden, Kristensen, & Sandøe, 2017), tyrosine kinase inhibitors (London et al., 2009) and radiation therapy (Hill et al., 2014).

Electrochemotherapy (ECT) combines the use of chemotherapy and electroporation to achieve local tumour control (Tozon et al., 2016). Gene electrotransfer (GET), also known as electro-gene transfer (EGT), is used in oncology to enhance the antitumor immune response (Impellizeri, Aurisicchio, Forde, & Soden, 2016). One of the most promising is GET of plasmid encoding interleukin-12 (IL-12), which has local and systemic effects on various tumors (Cemazar, Jarm, & Sersa, 2010). ECT alone, or combined with IL-12 GET, is efficient in treating selected tumors in cats and dogs with minimal or no side effects (Cemazar et al., 2017; Kodre et al., 2009; Lowe, Gavazza, Impellizeri, Soden, & Lubas, 2017; Milevoj et al., 2019; Salvadori et al., 2017; Tozon, Kodre, Sersa, & Cemazar, 2005; Tozon, Pavlin, Sersa, Dolinsek, & Cemazar, 2014). In human medicine, QoL has been assessed for patients undergoing irreversible electroporation

(Scheltema et al., 2018) and electrochemotherapy (Campana, Testori, Curatolo, & Quaglino, 2016). However, QoL has not been assessed for veterinary patients undergoing electroporation-based treatments, such as ECT or GET. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the owners' perception of HRQoL of dogs, treated with ECT alone or in combination with IL-12 GET and/or surgery.

2 | METHODS

The owners of dogs with histologically different tumours, treated with ECT alone or in combination with IL-12 GET and/or surgery, were offered the «Cancer Treatment Form» at least one month after treatment.

At the time of the treatment, each tumour nodule was measured in three perpendicular directions (*a*, *b* and *c*) and the tumour volume calculated using the following formula: $V = a \times b \times c \times \pi / 6$. One month after treatment, the response to the treatment was evaluated according to the RECIST criteria (Nguyen, Thamm, Vail, & London, 2015).

The HRQoL_{slo} questionnaire («Cancer Treatment Form») was adapted from the questionnaire for assessing HRQoL in dogs and cats with cancer, developed by Lynch et al., 2011. It is composed of 23 questions, divided in eight domains (happiness, mental status, pain, appetite, general appearance, hydration, mobility and general health) and designed to assess the physical and physiological aspects of the animal's health. Each domain had three statements scored on a scale from 1 (strongly disagree) to 5 (strongly agree). The final question was a Visual Assessment Scale (VAS) evaluation of current QoL ranging from 1 (very poor) to 10 (excellent) and providing an assessment of HRQoL on a continuum. Health was assessed as it was at the time the questionnaire was completed (from 1-worse, 3-the same to 5-better), compared with the health status before treatment. Four questions addressing wound care after treatment and treatment costs were added to the original questionnaire. The Slovenian version of the questionnaire was prepared based on content validity established by the veterinary and oncology experts. The internal reliability of the questionnaire was acceptable, with the Cronbach $\alpha = 0.6712$.

For the purposes of data processing, the basic descriptive statistics were used as well as a non-parametric Mann-Whitney U test to find out the statistically significant differences between the dogs' current HRQoL and the type of treatment and the assessment of treatment outcomes (Nguyen et al., 2015). In addition, a linear regression analysis was applied. $p \leq .05$ were considered significant.

3 | RESULTS

From October 2017 to April 2019, 44 dogs of different breeds with histologically different tumours were included in the prospective, non-randomized study. The age of dogs ranged from 5 to 16 years (median 9.0 years). A total of 29/44 (65.9%) of dogs were females and

TABLE 1 Demographic data and treatment groups

Gender		Age (years)		
Male	Female	6–8	9–12	13–16
15 (34.1%)	29 (65.9%)	19 (43.3%)	18 (40.9%)	7 (15.9%)
		n	%	
Breed				
Crossbreed		8	18.2	
German Boxer		3	6.8	
American Staffordshire Terrier		3	6.8	
Beagle		2	4.5	
West Highland White Terrier		2	4.5	
Cocker Spaniel		2	4.5	
French Bulldog		2	4.5	
Greyhound		2	4.5	
Boston Terrier		2	4.5	
Miniature Schnauzer		1	2.3	
Bull Terrier		1	2.3	
Jack Russell Terrier		1	2.3	
Jagdterrier		1	2.3	
Berger Blanc Suisse		1	2.3	
Pug		1	2.3	
Golden Retriever		1	2.3	
Maltese Dog		1	2.3	
English Setter		1	2.3	
Bloodhound		1	2.3	
Bernese Mountain Dog		1	2.3	
Flat-Coated Retriever		1	2.3	
Staffordshire Bull Terrier		1	2.3	
Alaskan Malamute		1	2.3	
Shetland Sheepdog		1	2.3	
Soft Coated Wheaten Terrier		1	2.3	
Basset Hound		1	2.3	
Weimeraner		1	2.3	
Type of tumour				
Mast cell tumour		30	68.2	
Oral malignant melanoma		4	9.1	
Plasma cell tumour		2	4.5	
Oral fibrosarcoma		2	4.5	
Neurofibrosarcoma		2	4.5	
Soft tissue sarcoma		1	2.3	
Histiocytic sarcoma		1	2.3	
Squamous cell carcinoma		1	2.3	
Fibrosarcoma		1	2.3	
Type of treatment				
ECT + GET		27	61.4	
Surgery + ECT + GET		8	18.2	

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Gender		Age (years)		
Male	Female	6–8	9–12	13–16
15 (34.1%)	29 (65.9%)	19 (43.3%)	18 (40.9%)	7 (15.9%)
		n	%	
GET			4	9.1
ECT			2	4.5
Surgery + GET			2	4.5
Surgery + ECT			1	2.3

15/44 (34.1%) were males. The most common breeds were crossbreed (18.2%), German Boxer (6.8%) and American Staffordshire Terrier (6.8%). The majority of dogs were diagnosed with mast cell tumours (68.2%), followed by oral malignant melanomas (9.1%), neurofibrosarcomas (4.5%), oral fibrosarcomas (4.5%), plasma cell tumours (4.5%) and other tumour types (9.2%). The volumes of the tumours ranged from 0 cm³ (residual microscopic disease) to 64.1 cm³ (median 2.05 cm³). The dogs were divided into two treatment groups. In the non-invasive treatment group, only ECT and/or IL-12 GET was performed. When ECT and/or IL-12 GET was used in combination with surgery, dogs were assigned to the invasive treatment group. There were 33/44 (75%) of animals in the non-invasive treatment group and 11/44 (25%) in the invasive treatment group. The demographic data and grouping are presented in Table 1.

In the general health assessment section, owners were asked to evaluate the changes in their pets' health after the treatment, based on a scale from 1 (strongly disagree) to 5 (strongly agree) (Table 2).

The majority of the owners assessed their dogs' mental state as good and their lives as happy. Most of the owners did not feel their dogs were showing signs of pain after the treatment and in their owners' opinion, the dogs' appetite and water intake were unchanged and they did not feel nauseated, vomited or have diarrhoea. Most of the owners did not notice hygiene or mobility disorders in their dogs.

The four additional questions were related to wound care and treatment costs. The results showed that 75% of the owners took care of their dog's wound, while 16% did not or the wound care was performed by another family member (4.5%). Two owners (4.5%) did not provide the information. To make it easier to take care of the wound, some of the owners expressed their desire for some additional material (25% written, 13.6% image and 2.3% video material) or a presentation of wound care by an expert (27.3%). The majority of the dogs' owners (86.4%) would opt for the therapy again, regardless of the financial costs. Three owners did not provide this information.

Overall, the owners assessed the general health compared with the initial diagnosis of cancer (from 1-worse to 5-better) as improving (mean 3.9, SD 1.1). In addition, the owners assessed their dogs' current HRQoL as good (from 1-very poor to 10-excellent) (mean 7.4, SD 2.8).

TABLE 2 Assessment of the "Cancer treatment form"

Domain	Item	Min	Max	Mean	SD
Happiness	My pet wants to play	2	5	4.5	0.9
	My pet responds to my presence	4	5	5.0	0.2
	My pet enjoys life	3	5	4.8	0.5
Mental status	My pet has more good days than bad days	3	5	4.7	0.6
	My pet sleeps more, is less awake	1	5	2.8	1.4
	My pet seems dull or depressed, not alert	1	5	1.4	0.9
Pain	My pet is in pain	1	5	1.9	1.2
	My pet pants frequently, even at rest	1	5	1.5	1.1
	My pet shakes or trembles occasionally	1	5	2.0	1.4
Appetite	My pet eats the usual amount of food	2	5	4.7	0.7
	My pet acts nauseated or vomits	1	4	1.6	0.8
	My pet eats treats/snacks	1	5	4.3	1.2
Hygiene	My pet keeps itself clean	1	5	1.4	1.0
	My pet smells like urine or has skin irritation	1	3	1.1	0.3
	My pet's hair is greasy, matted, rough	1	3	1.1	0.4
Water intake	My pet drinks adequately	4	5	4.9	0.3
	My pet has diarrhoea	1	5	2.1	1.3
	My pet is urinating a normal amount	2	5	4.7	0.8
Mobility	My pet moves normally	2	5	4.5	0.9
	My pet lays in one place all day long	1	5	1.8	1.2
	My pet is active as it has been	1	5	4.3	1.1

Specifically, the assessment of the dogs' current HRQoL compared the groups of dogs according to the treatment type (invasive vs. non-invasive treatment group), treatment response (Nguyen et al., 2015) (objective response (OR) vs. progressive disease (PD)), tumour size (tumour volume < 3 cm³ or > 3 cm³) and tumour type (oral vs. cutaneous and subcutaneous). The results are shown in Table 3.

Table 4 shows the differences among the treatment type, treatment outcome, type of tumour and tumour size and the dogs' current HRQoL, assessed by the owners.

The findings show statistically significant differences ($p < .05$) between the type of treatment and the dogs' current HRQoL. The owners assessed the current HRQoL as better among dogs receiving non-invasive treatment types. Furthermore, the results show that the owners assessed the current HRQoL as better among dogs that had an OR to the treatment, compared to those that had PD despite the treatment ($p < .05$). HRQoL in dogs with oral tumours was assessed as worse than those receiving treatment for cutaneous and subcutaneous tumours ($p < .05$). Besides, the owners assessed the current HRQoL as better among dogs with smaller tumours (tumour volume below 3 cm³) than in those with larger tumours (tumour volume above 3 cm³) ($p < .05$).

4 | DISCUSSION

Questionnaires assessing HRQoL are important tools for evaluating the effect of cancer and its treatment on body function and well-being.

Their use in veterinary medicine is becoming more and more important as they can help us with treatment decisions, provide prognostic information, evaluate the impact of novel treatments, improve the connection between owners and veterinarians and therefore make the owners feel more involved in the treatment procedure.

ECT is a local anti-cancer treatment method that can be used in the management of various types of tumours in dogs (Kodre et al., 2009; Spugnini et al., 2013; Tozon et al., 2005). One of the main characteristics of this type of therapy is the low probability of systemic side effects and excellent post-treatment function (e.g. mobility, food intake) of the treated animals (Kodre et al., 2009; Milevoj et al., 2019; Tozon et al., 2016; Tozon et al., 2005). When we combine it with IL-12 GET, our aim is to complement the local effect of the treatment with the systemic anti-cancer activity of IL-12 (Cemazar et al., 2017; Cemazar et al., 2010; Cutrera et al., 2015; Reed et al., 2010). Both type of treatments can be combined with surgery. Surgery can be performed either as a neo-adjuvant treatment to minimize the tumour burden, with ECT and/or GET performed subsequently after wound healing to treat microscopic residual disease. In cases of larger tumours or in less accessible locations, surgery can also be combined with intraoperative ECT and/or GET. When ECT and GET are coupled with surgery, prolonged wound healing is expected due to a more invasive treatment procedure.

After performing ECT and/or GET, tumour necrosis is possible and features such as oedema, erythema and local inflammation can last up to 2 weeks after treatment (Figure 1). After that, a crust is

TABLE 3 Descriptive statistics for the independent variables (type of treatment, treatment outcome, type of tumour and tumour size) and the dogs' current HRQoL assessment

	n	Mean	SD	Min	Max
Type of treatment					
Non-invasive (ECT + GET, ECT, GET)	33	8.07	2.016	1	10
Invasive (Surgery + ECT + GET, Surgery + ECT, Surgery + GET)	11	5.11	3.723	1	10
Treatment outcome					
OR - objective response (CR - complete response, PR - partial response)	36	8.16	2.018	1	10
PD - progressive disease	8	3.86	3.078	1	8
Type of tumour					
Oral tumours	6	5.00	3.082	1	8
Other tumours (cutaneous and subcutaneous)	38	7.74	2.574	1	10
Tumour size					
>3 cm ³	13	4.92	3.252	1	10
<3 cm ³	26	8.62	1.329	6	10

TABLE 4 Mann-Whitney U test for the independent variables (type of treatment, treatment outcome, type of tumour and tumour size) and the dogs' current HRQoL assessment

	M (Current HRQoL [†])	N [‡]	F/p value
Type of treatment			
Non-invasive (ECT + GET, ECT, GET)	8	30	73.000/.035
Invasive (Surgery + ECT + GET, Surgery + ECT, Surgery + GET)	5	9	
Treatment outcome			
OR - objective response (CR - complete response, PR - partial response)	8.5	32	26.000/.001
PD - progressive disease	3	7	
Type of tumour			
Oral tumours	5	5	37.000/.040
Other tumours (cutaneous and subcutaneous)	8	34	
Tumour size			
>3 cm ³	5	13	52.500/.000
<3 cm ³	9	26	

Abbreviation: M, median.

[†]HRQoL Scored 1=very poor to 10=excellent.

[‡]Five owners did not respond.

formed in the treated area and is expected to fall off approximately 1 month after treatment (Tozon et al., 2016). This is the optimal time to evaluate the response to the treatment according to the RECIST criteria (Nguyen et al., 2015) and the reason why the questionnaires were offered to the owners at least 1 month after treatment, when they have already experienced all the phases of wound healing. We believe that after the completion of treatment, the owners could also assess their dogs' HRQoL more objectively than during the period of tumour necrosis or wound healing.

The response to the treatment has an important effect not just on the treated animal, but also on their owner's perception on the

HRQoL. It is natural that the owners of animals that have poor response to treatment will assess that the life quality of their animal is the same or even worse than after treatment, even when this is not obvious from the clinician's viewpoint. This may be an actual reflection of the owner's disappointment of the cancer treatment failure, which may be especially difficult to accept. It was already proven that the owners of non-responder animals evaluated their animals' HRQoL as worse than the owners of responding animals (London et al., 2009). This was also shown in our study, where there was a statistically significant difference between the current HRQoL assessment between responders (dogs with an OR to

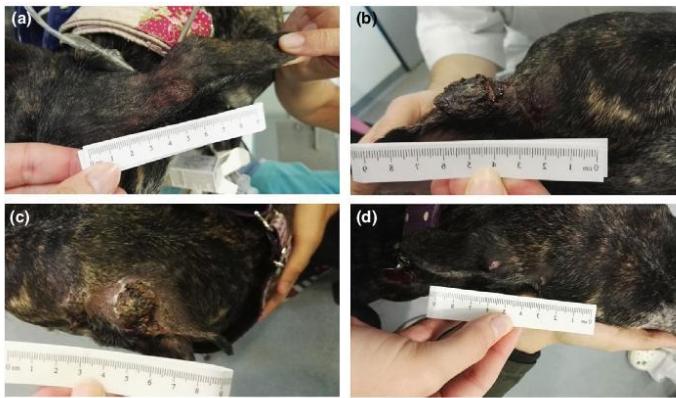


FIGURE 1 Treatment response to ECT and IL-12 GET of a 6-year-old Greyhound with a mast cell tumour on the left ear base. (a) Before treatment, (b) 1 week after treatment (local inflammation with oedema and erythema), (c) 2 weeks after treatment (crust formation) and (d) 6 weeks after treatment (crust falls off and evaluation of treatment response can be performed)

treatment) and non-responders (dogs with PD despite the treatment) (Table 3).

Whereas the response rate of cutaneous and subcutaneous tumours to ECT and/or IL-12 GET is up to 100% (Cemazar et al., 2017; Kodre et al., 2009; Tozon et al., 2005), the response rate of oral tumours is still relatively low, ranging from 11% to 50%, depending on the tumour type (Cutrera et al., 2015; Milevoj et al., 2019; Reed et al., 2010). This is the reason we divided our treatment groups into dogs with oral tumours (oral malignant melanoma and oral fibrosarcoma) and compared the owner's perception of HRQoL with the rest of the dogs who had cutaneous and subcutaneous tumours of different histological diagnoses (Table 1). The owners of dogs with oral tumours evaluated their animals' HRQoL as statistically significantly worse than the owners of dogs with cutaneous and subcutaneous tumours.

Furthermore, we divided the dogs into invasive (when surgery was performed together with ECT and/or IL-12 GET) and non-invasive (ECT and/or IL-12 GET only) treatment groups. We found that the owners of dogs in the non-invasive treatment group assessed their dogs' HRQoL as significantly better than the ones in the invasive treatment group. The result could be explained to the fact that the healing process of wounds, resulting from electroporation-based treatments combined with surgery, is expected to take more time. This can represent a bigger burden for the owner and may impact the dog's and the owner's life routine for a longer time than we expect if we do not combine ECT and/or IL-12 GET with surgery. Some of the owners might also think that the HRQoL of those animals is impaired due to a need for more frequent visits to the veterinarian, which might represent a stress for some of the dogs. Also, a significant proportion of the dogs in the invasive treatment group were dogs that had oral tumours. Lower assessment of QoL in the invasive treatment group could therefore be assigned to a lower response rate rather than to the surgical procedure itself. This could potentially represent a bias of the results and a bigger cohort of patients with cutaneous and subcutaneous tumours, treated with ECT and/or GET in combination with surgery, could help us distinguish whether it is the treatment or the disease itself that has more significant impact on the dogs' QoL.

The size of a tumour correlates with the expected amount of necrosis after treatment with ECT and GET. Larger tumours can therefore represent a bigger burden for the owner because the treatment period is prolonged and the animals require more care from the owners. Also, in cases of larger tumours, a postoperative course of NSAIDs (3 to 5 days) is frequently required, which can influence the owners' perception of QoL of the animals. This is why we compared the assessment of QoL of animals with smaller (tumour volume < 3 cm³) and larger (tumour volume > 3 cm³) tumours. The results indeed show that the owners assessed the current HRQoL as better among dogs with smaller tumours than in those with larger tumours.

The questionnaire also revealed a high owner compliance rate, with 80% of owners taking care of their animals' wounds. Some of the owners expressed the desire for some additional written (25%), image (13.6%) or video (2.3%) material and a presentation of wound care by an expert (27.3%). This can be used as a guidance for further client education, meet the owners' expectations regarding post-treatment results and improvement of owner-veterinarian interaction.

There are three major limitations of the study. Firstly, in all of the instruments measuring HRQoL in animals, there is a need for proxy reporting, which is done by the owner. This may not necessarily represent the true HRQoL of the animal and can be influenced by several factors, for example, the personality of the owner or treatment outcome. The second limitation is that animals with oncological diseases are usually older and often have concurrent diseases that might impact their HRQoL. In those cases, it is often difficult for the owner to separate between the impact of the tumour or its treatment and the concurrent disease on their animal's life quality. The third limitation is that the questionnaire was designed for both dogs and cats that have very different behaviours and means of expressing their HRQoL. In the future, separate questionnaires should be designed for both species to obtain results that are more detailed. A minor limitation of the study is the internal reliability of the questionnaire, with the Cronbach $\alpha = 0.6712$. Although Field (Field, 2009) states that the constructs

values between 0.6 and 0.7 are the minimum acceptable value for Cronbach α , further psychometric analysis of the questionnaire should be performed.

The improvement in HRQoL and owner satisfaction with the treatment is in concordance with the results from the study performed in human patients, where the authors observed a significantly increased HRQoL in patients treated with ECT (Campana et al., 2016). In the mentioned study, the patient satisfaction with the treatment outcome was 80%, which is comparable to our data, demonstrating that 86% of owners were satisfied with the treatment and would opt for the therapy again, regardless of the cost. Moreover, the questionnaire has a wide valuable use not only for animals undergoing electroporation-based treatments but also for other animals undergoing different oncological treatments (Lynch et al., 2011), and could be used in the future to evaluate HRQoL in bigger cohorts of cancer-bearing animals. Namely, this is the first HRQoL questionnaire ever used in Slovenia and an important starting point for evaluation of HRQoL in Slovenian veterinary patients.

In conclusion, the results of this study provided a valuable and encouraging feedback from the owners of treated dogs. The questionnaire was very well accepted by the owners and proved as a useful tool for the assessment of HRQoL in dogs treated with ECT and/or IL-12 GET. It could therefore serve as a tool for evaluating the HRQoL of animals undergoing other oncological treatments in the future. The owners of dogs with cutaneous and subcutaneous tumours treated with ECT and/or IL-12 GET without addition of surgery and those that responded to the treatment evaluated their dogs' HRQoL as better than the owners of dogs with oral tumours, those where surgery was included in the treatment protocol and those that did not respond to the treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Slovenian Research Agency (grant numbers P3-0003, P4-0053, J3-6796). Research was conducted in the scope of the EBAM European Associated Laboratory (LEA) and resulted from the networking efforts of the COST Action TD1104 (www.electroporation.net). The investment is co-financed by the Republic of Slovenia and the European Regional Development Fund.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICAL STATEMENT

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to. No ethical approval was required as this was a questionnaire-based study that did not involve any direct work on experimental animals.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Nina Milevoj  <https://orcid.org/0000-0002-2410-7553>

Natasa Tozon  <https://orcid.org/0000-0002-9831-992X>

Sabina Lican  <https://orcid.org/0000-0002-8795-7985>

Ursa Lamprecht Tratar  <https://orcid.org/0000-0003-2905-4574>

Gregor Sersa  <https://orcid.org/0000-0002-7641-5670>

Maja Cemazar  <https://orcid.org/0000-0002-1418-1928>

REFERENCES

- Belshaw, Z., & Yeates, J. (2018). Assessment of quality of life and chronic pain in dogs. *The Veterinary Journal*, 239, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.07.010>
- Bijsmans, E. S., Jepson, R. E., Syme, H. M., Elliott, J., & Niessen, S. J. M. (2016). Psychometric validation of a general health quality of life tool for cats used to compare healthy cats and cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, <https://doi.org/10.1111/jvim.13656>
- Bottomey, A., Flechner, H., Efficace, F., Vanvoorden, V., Coens, C., Therasse, P., ... Greimel, E. (2005). Health related quality of life outcomes in cancer clinical trials. *European Journal of Cancer*, 41, 1697–1709. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.007>
- Budke, C. M., Levine, J. M., Kerwin, S. C., Levine, G. J., Hettlich, B. F., & Slater, M. R. (2008). Evaluation of a questionnaire for obtaining owner-perceived, weighted quality-of-life assessments for dogs with spinal cord injuries. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233, 925–930.
- Campana, L. G., Testori, A., Curatolo, P., & Quaglino, P. (2016). Treatment efficacy with electrochemotherapy: A multi-institutional prospective observational study on 376 patients with superficial tumors. *European Journal of Surgical Oncology*, 42, 1914–1923.
- Cella, D. F. (1992). Overcoming difficulties in demonstrating health outcome benefits. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 16(6_suppl), 106S–111S. <https://doi.org/10.1177/014860719201600613>
- Cemazar, M., Ambrozic Avgustin, J., Pavlin, D., Sersa, G., Poli, A., Krhac Levacic, A., ... Tozon, N. (2017). Efficacy and safety of electrochemotherapy combined with peritumoral IL-12 gene electrotransfer of canine mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15, 641–654. <https://doi.org/10.1111/vco.12208>
- Cemazar, M., Jarm, T., & Sersa, G. (2010). Cancer electrogene therapy with interleukin-12. *Current Gene Therapy*, 10, 300–311. <https://doi.org/10.2174/156652310791823425>
- Cutrer, J., King, G., Jones, P., Kicenuk, K., Gumpel, E., Xia, X., & Li, S. (2015). Safe and effective treatment of spontaneous neoplasms with interleukin 12 electro-chemo-gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19, 664–675. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12382>
- Faustino, L., & Lallo, M. (2015). Quality of life and pain in dogs with early-stage mammary tumours. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63, 451–457. <https://doi.org/10.1556/004.2015.042>
- Field, A. (Ed.). (2009). Exploratory factor analysis. In *Discovering statistics using SPSS. Introducing statistical methods* (pp. 627–685). London: Sage Publications Ltd.
- Freeman,L.M.,Rush,J.E.,Farabaugh,A.E.,&Must,A.(2005).Development and evaluation of a questionnaire for assessing health-related quality of life in dogs with cardiac disease. *American Journal of Veterinary Research*, 226, 1864–1868. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1864>
- Freeman, L. M., Rush, J. E., Oyama, M. A., MacDonald, K. A., Cunningham, S. M., Bulmer, B., ... Trafny, D. J. (2012). Development and evaluation of a questionnaire for assessment of health-related quality of life in cats with cardiac disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240, 1188–1193. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1864>

- Greenhalgh, S. N., Reeve, J. A., Johnstone, T., Goodfellow, M. R., Dunning, M. D., O'Neill, E. J., ... Trafny, D. J. (2014). Long-term survival and quality of life in dogs with clinical signs associated with a congenital portosystemic shunt after surgical or medical treatment. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236, 1215-1220. <https://doi.org/10.2460/javma.245.5.527>
- Hill, M., Hirschberger, J., Zimmermann, K., Dörfelt, R., Reese, S., & Wergin, M. (2014). Quality of life in primary and adjuvant veterinary radiation therapy. An owner survey. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*, 42, 157-165.
- Liopoulou, M. A., Kitchell, B. E., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2013). Development of a survey instrument to assess health-related quality of life in small animal cancer patients treated with chemotherapy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 242, 1679-1687. <https://doi.org/10.2460/javma.242.12.1679>
- Impellizeri, J., Aurisicchio, L., Forde, P., & Soden, D. M. (2016). Electroporation in veterinary oncology. *The Veterinary Journal*, 217, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.05.015>
- Kodre, V., Cemazar, M., Pecar, J., Sersa, G., Cor, A., & Tozon, N. (2009). Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. *Vivo*, 23, 55-62.
- London, C. A., Malpas, P. B., Wood-Folli, S. L., Boucher, J. F., Rusk, A. W., Rosenberg, M. P., ... Michels, G. M. (2009). Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clinical Cancer Research*, 15, 3856-3865. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-1860>
- Lowe, R., Gavazza, A., Impellizeri, J. A., Soden, D. M., & Lubas, G. (2017). The treatment of canine mast cell tumours with electrochemotherapy with or without surgical excision. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15, 775-784. <https://doi.org/10.1111/vco.12217>
- Lynch, S., Savary-Bataille, K., Leeuw, B., & Argyle, D. J. (2011). Development of a questionnaire assessing health-related quality-of-life in dogs and cats with cancer. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9, 172-182.
- Mellanby, R. J., Herrtage, M. E., & Dobson, J. M. (2003). Owners' assessments of their dog's quality of life during palliative chemotherapy for lymphoma. *Journal of Small Animal Practice*, 44, 100-103. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00037.x>
- Milevoj, N., Tratar, U. L., Nemec, A., Brožić, A., Žnidar, K., Serša, G., ... Tozon, N. (2019). A combination of electrochemotherapy, gene electrotransfer of plasmid encoding canine IL-12 and cytoreductive surgery in the treatment of canine oral malignant melanoma. *Research in Veterinary Science*, 122, 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.11.001>
- Nguyen, S. M., Thamm, D. H., Vail, D. M., & London, C. A. (2015). Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): A Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13, 176-183. <https://doi.org/10.1111/vco.12032>
- Niessen, S. J., Powney, S., Guitian, J., Niessen, A. P., Pion, P. D., Shaw, J. A., & Church, D. B. (2012). Evaluation of a quality-of-life tool for dogs with diabetes mellitus. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26, 953-961. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00947.x>
- Noli, C., Borio, S., Varina, A., & Schievano, C. (2016). Development and validation of a questionnaire to evaluate the quality of life of cats with skin disease and their owners, and its use in 185 cats with skin disease. *Veterinary Dermatology*, 27, 247-e258. <https://doi.org/10.1111/vde.12341>
- Noli, C., Colombo, S., Cornegliani, L., Ghibaudo, G., Persico, P., Vercelli, A., & Galzerano, M. (2011). Quality of life of dogs with skin disease and of their owners. Part 2: Administration of a questionnaire in various skin diseases and correlation to efficacy of therapy. *Veterinary Dermatology*, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2011.00956.x>
- Noli, C., Minafò, G., & Galzerano, M. (2011). Quality of life of dogs with skin diseases and their owners. Part 1: Development and validation of a questionnaire. *Veterinary Dermatology*, 22, 344-351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00954.x>
- Oyama, M. A., Rush, J. E., O'Sullivan, M. L., Williams, R. M., Rozanski, E. A., Petrie, J. P., ... Brown, D. C. (2008). Perceptions and priorities of owners of dogs with heart disease regarding quality versus quantity of life for their pets. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233, 104-108. <https://doi.org/10.2460/javma.233.1.104>
- Packer, R. M. A., & Volk, H. A. (2015). Epilepsy beyond seizures: A review of the impact of epilepsy and its comorbidities on health-related quality of life in dogs. *The Veterinary Record*, 177, 306-315. <https://doi.org/10.1136/vr.103360>
- Reed, S. D., Fulmer, A., Buckholz, J., Zhang, B., Cutrera, J., Shiomi, K., & Li, S. (2010). Bleomycin/interleukin-12 electrochemogenotherapy for treating naturally occurring spontaneous neoplasms in dogs. *Cancer Gene Therapy*, 17, 571-578. <https://doi.org/10.1038/cgt.2010.13>
- Reynolds, C. A., Oyama, M. A., Rush, J. E., Rozanski, E. A., Singletary, G. E., Brown, D. C., ... Hogan, D. F. (2010). Perceptions of quality of life and priorities of owners of cats with heart disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(6), 1421-1426. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0583.x>
- Salvadori, C., Svara, T., Rocchigiani, G., Millanta, F., Pavlin, D., Cemazar, M., ... Poli, A. (2017). Effects of electrochemotherapy with cisplatin and peritumoral IL-12 gene electrotransfer on canine mast cell tumors: A histopathologic and immunohistochemical study. *Radiology and Oncology*, 51, 286-294. <https://doi.org/10.1515/raon-2017-0035>
- Scheltema, M. J., Chang, J. I., van den Bos, W., Gielchinsky, I., Nguyen, T. V., Reijke, T. M., ... Stricker, P. D. (2018). Impact on genitourinary function and quality of life following focal irreversible electroporation of different prostate segments. *Diagnostic and Interventional Radiology*, 24, 268-275.
- Silva, N. E. O. F., Luna, S. P. L., Joaquim, J. G. F., Coutinho, H. D., & Possebon, F. S. (2017). Effect of acupuncture on pain and quality of life in canine neurological and musculoskeletal diseases. *Canadian Veterinary Journal*, 58, 041-51.
- Spugnini, E. P., Di Tosto, G., Salemma, S., Pecchia, L., Fanciulli, M., & Baldi, A. (2013). Electrochemotherapy for the treatment of recurring aponeurotic fibromatosis in a dog. *Canadian Veterinary Journal*, 54, 606-609.
- Thornton, L. A., Cave, N., Bridges, J. P., & Stell, A. J. (2018). Owner perceptions of their cat's quality of life when treated with a modified University of Wisconsin-Madison protocol for lymphoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 20, 356-361. <https://doi.org/10.1177/1098612x17710844>
- Tozon, N., Kodre, V., Sersa, G., & Cemazar, M. (2005). Effective treatment of perianal tumors in dogs with electrochemotherapy. *Anticancer Research*, 25, 839-845. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2012.10.004>
- Tozon, N., Lamprecht Tratar, U., Znidar, K., Sersa, G., Teissie, J., & Cemazar, M. (2016). Operating procedures of the electrochemotherapy for treatment of tumor in dogs and cats. *Journal of Visualized Experiments*, (116), 1-7. <https://doi.org/10.3791/54760>
- Tozon, N., Pavlin, D., Sersa, G., Dolinsek, T., & Cemazar, M. (2014). Electrochemotherapy with intravenous bleomycin injection: An observational study in superficial squamous cell carcinoma in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16, 291-299. <https://doi.org/10.1177/1098612x13507071>
- Tzannes, S., Hammond, M. F., Murphy, S., Sparkes, A., & Blackwood, L. (2008). Owners' perception of their cat's quality of life during COP chemotherapy for lymphoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2007.05.008>

MILEVOJ ET AL.

WILEY 19

- Vøls, K. K., Heden, M. A., Kristensen, A. T., & Sandøe, P. (2017). Quality of life assessment in dogs and cats receiving chemotherapy - A review of current methods. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15, 684–691, <https://doi.org/10.1111/vco.12242>
- Wessmann, A., Volk, H. A., Packer, R. M. A., Ortega, M., & Anderson, T. J. (2016). Quality-of-life aspects in idiopathic epilepsy in dogs. *The Veterinary Record*, 179, 229. <https://doi.org/10.1136/vr.103355>
- Yam, P. S., Butowski, C. F., Chitty, J. L., Naughton, G., Wiseman-Orr, M. L., Parkin, T., & Reid, J. (2016). Impact of canine overweight and obesity on health-related quality of life. *Preventive Veterinary Medicine*, 127, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.03.013>

How to cite this article: Milevoj N, Tozon N, Licen S, Lamprecht Tratar U, Sersa G, Cemazar M. Health-related quality of life in dogs treated with electrochemotherapy and/or interleukin-12 gene electrotransfer. *Vet Med Sci*. 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1002/vms3.232>