

Aus der Medizinischen Kleintierklinik
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Johannes Hirschberger

**A 13-week Dose Intensifying Simultaneous Combination
Chemotherapy (DISC) Protocol for Malignant Lymphoma in
Dogs: 21 Cases**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Isabella Zenker

aus

München

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekanat: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Wolfram Breuer

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Chemotherapie	2
2.1.1	Prinzipien der Chemotherapie	2
2.1.2	Wirkstoffe	2
2.1.2.1	Doxorubicin	3
2.1.2.2	Cyclophosphamid	3
2.1.2.3	Vincristin	3
2.1.2.4	L-Asparaginase	4
2.1.2.5	Prednisolon	4
2.2	Das maligne Lymphom des Hundes	4
2.2.1	Ätiologie und Inzidenz	5
2.2.2	Klassifikation	5
2.2.2.1	Anatomische Formen	5
2.2.2.1.1	Multizentrische Form	5
2.2.2.1.2	Mediastinale Form	6
2.2.2.1.3	Gastrointestinale Form	6
2.2.2.1.4	Extranodale Formen	6
2.2.2.2	Immunotypisierung und histologische Einteilung	7
2.2.3	Klinische Stadieneinteilung (Staging)	8
2.2.4	Diagnose	8
2.2.5	Prognostische Faktoren und Prognose	9
2.2.6	Therapie	9
2.2.6.1	Mono-Chemotherapie-Protokolle	10
2.2.6.2	Kombinations-Chemotherapie-Protokolle	10
2.3	Dosis-intensivierende Protokolle – Vergleich zur Humanmedizin	10
III.	PUBLIKATION	12
IV.	DISKUSSION	38

4.1	Dosissteigerung und Dosisintensität	38
4.2	Staging	39
4.3	Toxizität	39
4.4.	Remissionsrate und –dauer	41
4.5	Individuelle Dosissteigerung	41
4.6	Schlußbetrachtung	42
V.	ZUSAMMENFASSUNG	43
VI.	SUMMARY	44
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	45
VIII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	54
	DANKSAGUNG	57

I. EINLEITUNG

Das maligne Lymphom ist die häufigste hämatopoetische Neoplasie des Hundes mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 24 – 114 Fällen/100 000 Hunde (DORN *et al.*, 1968, DORN *et al.*, 1970, DOBSON *et al.*, 2002). Die Tumorzellen finden sich bevorzugt in sekundären lymphatischen Organen, wie Lymphknoten, Leber und Milz (LEIFERT und MATUR, 1986). Es kann in der Regel sehr erfolgreich mit Kombinations-Chemotherapie-Protokollen behandelt werden (MYERS *et al.*, 1997, ZEMANN *et al.*, 1998, BOYCE und KITCHELL, 2000, MOORE *et al.*, 2001, SIMON *et al.*, 2006). Bei diesen Protokollen werden Medikamente aus unterschiedlichen Wirkstoffgruppen, d. h. mit verschiedenen Wirkmechanismen kombiniert. Sie werden im kürzest möglichen Abstand – meist wöchentlich – und der maximal tolerierten Dosis appliziert. Durch dieses Vorgehen kann eine maximale Antitumorwirkung bei akzeptablen Nebenwirkungen erzielt werden (O'KEEFE *et al.*, 1993). Bei den meisten Protokollen werden im wöchentlichen Wechsel Zytostatika aus unterschiedlichen Wirkstoffgruppen appliziert. Die am häufigsten verwendeten Medikamente sind L-Asparaginase, Vincristin, Cyclophosphamid und Doxorubicin. Dieser wöchentliche Rhythmus wird je nach Protokoll über 12 bis 25 Wochen fortgeführt (GARRETT *et al.*, 2002, SIMON *et al.*, 2006). Generell werden mit Doxorubicin-haltigen Kombinations-Protokollen im Vergleich zu Doxorubicin-freien Protokollen längere Überlebenszeiten erreicht (ETTINGER, 2003). Ein Nachteil bei der gleichzeitigen Gabe von Zytostatika kann ihre überlappende Toxizität, wie z. B. ihre myelosuppressive Wirkung sein. Wie in einer Studie von Bailey und Kollegen gezeigt wurde, konnten Carboplatin und Doxorubicin zur Therapie eines appendikulären Osteosarkoms bei gleichzeitiger Gabe nur in deutlich reduzierten Dosen appliziert werden. Statt 30 mg/m² bei Doxorubicin-Monotherapie und 300 mg/m² bei Carboplatin-Monotherapie konnten den Patienten nur 15 mg/m² bzw. 175 mg/m², ohne bedrohliche Zytopenien auszulösen, zeitgleich verabreicht werden (BAILEY *et al.*, 2003). Auch gibt es in der Tiermedizin nur eine Studie zu einem Dosis-intensivierenden Protokoll zur Behandlung des kaninen malignen Lymphoms. Die so therapierten Hunde erhielten anschließend eine autologe Knochenmarkstransplantation. Die mediane Remissionszeit betrug 26,6 Wochen. Allerdings wurden Hunde mit Knochenmarksbefall und somit einer bereits schlechteren Prognose von dieser Studie ausgeschlossen (FRIMBERGER *et al.*, 2006). In einer weiteren Studie konnte bei Hunden mit malignem Lymphom unter Chemotherapie kein Einfluss von Dosisreduktion oder Therapieverzögerung, auf die Dauer der ersten Remission gefunden werden. Allerdings war bei Hunden, die Grad III oder Grad IV Neutropenien zeigten, die Remissionszeit signifikant verlängert (VAUGHAN *et al.*, 2007). Die wöchentliche Applikation von Doxorubicin bei Hunden mit malignem Lymphom in einer reduzierten Dosis (10 mg/m², statt alle 3 Wochen 30 mg/m²) zeigte zwar deutlich weniger Nebenwirkungen, v. a. weniger Zytopenien, allerdings erreichten kaum Hunde eine komplette Remission (OGILVIE *et al.*, 1991). In dieser Studie blieb zwar die Summationsdosis gleich, jedoch war die Dosis-Intensität zum Zeitpunkt der Applikation deutlich verringert. Bei der simultanen Applikation verschiedener Zytostatika könnte somit, bei nicht überlappender Toxizität, durch eine gesteigerte Dosis-Intensität längere Remissionszeiten bei weniger Nebenwirkungen erreicht werden.

Die Hypothese der nachfolgenden Studie ist, dass durch die simultane Applikation drei verschiedener Chemotherapeutika (Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin) aus unterschiedlichen Wirkstoffgruppen mit individueller Dosissteigerung weniger Nebenwirkungen bei gleichbleibend hoher Remissionsrate und gleichbleibenden oder längeren Remissionszeiten resultieren.

II. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Chemotherapie

Vor allem schnell proliferierende Zellen können durch Zytostatika abgetötet werden. Meist verursachen diese zytotoxischen Medikamente letale Schäden an der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Zytostatika können Zell-Zyklus spezifisch oder unspezifisch wirken (CHUN *et al.*, 2007).

2.1.1 Prinzipien der Chemotherapie

Proliferierende Zellen durchlaufen die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Diese sind die S-Phase (S für Synthese), die G₁-Phase (G für ‚gap‘), die eigentliche Mitose (M-Phase) und die G₂-Phase. Im Prinzip wird während der S-Phase DNA und werden während der G-Phasen Proteine und RNA (Ribonukleinsäure) synthetisiert. Zellen in der G₀-Phase befinden sich in einer Art Ruhephase, können dem Zellzyklus auch wieder beitreten. Zytostatika schädigen meist die DNA und führen so zum Verlust der Replikationsfähigkeit oder sogar zum programmierten Zelltod (Apoptose). Wieder andere Chemotherapeutika hemmen eine bestimmte Phase des Zellzyklus. Da schnell proliferierende Zellen besonders sensibel auf eine Schädigung der DNA reagieren, sprechen vor allem schnell wachsende Tumoren auf eine zytostatische Behandlung an.

In folgenden Fällen können Patienten von einer Chemotherapie profitieren (CHUN *et al.*, 2007):

1. bei chemosensitiven Tumoren
2. als adjuvante Therapie zur Eradikation von Mikrometastasen
3. als adjuvante Therapie zur Verhinderung eines lokalen Rezidivs
4. als palliative Therapie zur Minderung klinischer Symptome
5. als Radiosensitizer

Anhand des Gompertschen Modells lässt sich ersehen, dass die Wachstumsfraktion innerhalb eines Tumors nicht konstant ist. Anfangs steigt die Wachstumskurve exponentiell an, jedoch sind in dieser Phase die meisten Tumoren klinisch noch nicht feststellbar. Im weiteren Verlauf flacht sich die Kurve ab und bildet ein Plateau (NORTON, 1988). Hier sprechen die meisten Zellen nur noch schlecht auf eine zytostatische Therapie an. Tumoren mit einer größeren Wachstumsfraktion sprechen somit besser auf eine Chemotherapie an, da sich hier mehr Zellen aktiv teilen (CHUN *et al.*, 2007). Ein weiteres Modell ist das Skipper-Schabell-Wilcox-Modell, auch ‚log-kill-Modell‘ genannt, bei dem von einem exponentiellen Wachstum aller Tumorzellen ausgegangen wird, d. h. unabhängig von seiner Ausgangsgröße benötigt ein Tumor immer die gleiche Zeit um seine Zellzahl zu verdoppeln. Auch wird bei einer zytostatischen Therapie davon ausgegangen, dass immer derselbe Prozentsatz an Tumorzellen getötet wird, d. h. unabhängig von der Ausgangszellzahl wird die Zellpopulation immer um 90 % dezimiert. Dies ist der sog. ‚log-kill‘ (NORTON und SURBONE, 1996). Klinisch hat sich dieses Modell jedoch nicht bestätigt.

2.1.2 Wirkstoffe

In der Tiermedizin wird zur Chemotherapie eine Vielzahl zytostatischer Wirkstoffe eingesetzt. Die häufigsten Medikamente, die bei der Therapie des malignen Lymphoms des Hundes verwendet werden, sind L-Asparaginase, Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin und Prednisolon (MACEWEN *et al.*, 1981, COTTER und GOLDSTEIN, 1983, CARTER *et al.*, 1987, MOORE *et al.*, 2001, GARRETT *et al.*, 2002, SIMON *et al.*, 2006). Diese Substanzen wurden, bis auf L-Asparaginase, im „CHOP“-Protokoll in der Humanmedizin zur Therapie des Non-Hodgkin-Lymphoms verwendet.

2.1.2.1 Doxorubicin

Doxorubicin gehört zu den Anthrazyklin-Antibiotika und wurde vor über 40 Jahren entdeckt (ARCAMONE *et al.*, 1969). Es ist eines der am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika, sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin. Es ist besonders wirksam bei hämatopoetischen Neoplasien, wie z. B. dem malignen Lymphom (DOROSHOW, 2006), wird aber auch zur adjuvanten Chemotherapie bei Hämangiosarkomen, Osteosarkomen und anderen Karzinomen eingesetzt (BERG *et al.*, 1995, MOORE *et al.*, 1996, BASKIN *et al.*, 2000, SORENMO *et al.*, 2004, SIMON *et al.*, 2006, MCNEILL *et al.*, 2009). Doxorubicin hemmt unter anderem die Topoisomerase II und führt zur Interkalation der DNA, was wiederum die Proteinsynthese hemmt und zur Bildung von Eisen-abhängigen freien Radikalen führt. Es ist Zell-Zyklus unspezifisch. Doxorubicin wird in der Leber metabolisiert und primär über den Kot ausgeschieden (BENJAMIN, 1975). Die Standarddosierung beträgt 30 mg/m² alle zwei bis drei Wochen. Da kleine Hunde (< 12 kg Lebendmasse) und Katzen mit dieser Dosierung potentiell überdosiert werden, wird bei diesen Tieren 1 mg/kg verabreicht. Doxorubicin sollte darüber hinaus auch immer streng intravenös verabreicht werden, da es ein sehr potentes vesikantes Arzneimittel ist und bei paravenöser Injektion zu massiven Gewebnekrosen führt. Zur Vermeidung von Hypersensitivitätsreaktionen sollte Doxorubicin als langsame Infusion verabreicht werden (CHUN *et al.*, 2007). Weitere Nebenwirkungen neben Hypersensitivitätsreaktionen und Paravasaten sind in seltenen Fällen akut auftretende Arrhythmien (MAULDIN *et al.*, 1992). Chronisch kumulative Nebenwirkungen sind beim Hund die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie, besonders ab kumulativen Dosen von 180-240 mg/m² (MAULDIN *et al.*, 1992). Diese Kardiotoxizität kann durch die Gabe von Dexrazoxan verzögert oder gemildert werden (HERMAN und FERRANS, 1998, CVETKOVIC und SCOTT, 2005). Bei Katzen kann es zu einer kumulativen Nephrotoxizität kommen (O'KEEFE *et al.*, 1993). Darüber hinaus ist Doxorubicin myelosuppressiv und kann zu gastrointestinalen Nebenwirkungen führen (CHUN *et al.*, 2007).

2.1.2.2 Cyclophosphamid

Cyclophosphamid ist eine sog. Wirkstoffvorstufe (Pro-Drug) und muss erst in der Leber in seine aktiven Metaboliten (4-Hydroxycyclophosphamid und Aldophosphamid) umgewandelt wird. Nebenprodukte sind unter anderem Carboxyphosphamid und Acrolein. Cyclophosphamid und seine Metaboliten werden primär über den Urin ausgeschieden. Die Dosierungen für Cyclophosphamid variieren sehr stark, je nach verwendetem Protokoll. Niedrige, kontinuierlich zu applizierende Dosen werden oral verabreicht, höhere Bolusdosen werden meist intravenös appliziert (50-300 mg/m²) (TESKE *et al.*, 2002, SIMON *et al.*, 2006, LANA *et al.*, 2007). Die häufigste Nebenwirkung von Cyclophosphamid ist eine Myelosuppression. Des Weiteren kann es durch den Metaboliten Acrolein zu einer sterilen hämorrhagischen Zystitis kommen. Der Cyclophosphamid-Metabolit Acrolein schädigt direkt das Harnblasenepithel. Zu dieser Komplikation kann es sowohl nach einer einmaligen Gabe wie auch nach chronischer Applikation kommen (PETERSON *et al.*, 1992, CROW *et al.*, 1977, CHARNEY *et al.*, 2003). Durch die gleichzeitige Gabe eines Diuretikums, z. B. Furosemid, kann die Inzidenz einer sterilen hämorrhagischen Zystitis drastisch gesenkt werden (CHARNEY *et al.*, 2003). Cyclophosphamid wird meist in Kombinationsprotokollen zur Behandlung des malignen Lymphoms, Hämangiosarkoms und Übergangszellkarzinoms der Harnblase und in der metronomischen Therapie eingesetzt (MOORE *et al.*, 1996, HELFLAND *et al.*, 1994, SORENMO *et al.* 2004, ELMSLIE *et al.*, 2008).

2.1.2.3 Vincristin

Vincristin wirkt im Gegensatz zu den anderen hier diskutierten Zytostatika Zell-Zyklus-spezifisch und gehört zur Gruppe der Vinka-Alkaloide oder Spindelgifte. Vincristin verhindert den Zusammenbau der

Mikrotubuli für die Mitosespindel, wirkt also spezifisch in der M-Phase des Zellzyklus (JORDAN *et al.*, 1991). Da Vincristin hochgradig Gewebe-reizend ist, muss es streng intravenös verabreicht werden (ROWINSKY, 2006). In der Veterinärmedizin übliche Dosierungen reichen von 0,5 bis 0,75 mg/m² als Bolusinjektion. Vincristin kann im wöchentlichen Abstand verabreicht werden. Häufige Nebenwirkungen sind v. a. gastrointestinaler Natur und reichen von Anorexie, Erbrechen über Durchfall bis hin zum paralytischen Ileus (ROWINSKY, 2006, CHUN *et al.*, 2007). Vincristin gilt als moderat myelosuppressiv, jedoch sind vor allen nach der kombinierten Gabe mit L-Asparaginase hochgradige Neutropenien beschrieben (NORTHRUP *et al.*, 2002). Vincristin wird in der Leber metabolisiert und über den Kot ausgeschieden. Bei beeinträchtigter Leberfunktion ist die Gabe von Vincristin kontraindiziert (GOLDEN und LANGSTON, 1988).

2.1.2.4 L-Asparaginase

L-Asparaginase ist ein bakterielles Enzym, welches die Aminosäure Asparagin spaltet. Viele Tumorzellen besitzen jedoch ein endogenes Enzym, die Asparagin-Synthetase, und sind in der Lage, nach Gabe von L-Asparaginase, dieses Enzym hoch zu regulieren und bilden so schnell eine Resistenz gegenüber diesem Medikament aus (HAWKINS *et al.*, 2004). Vor allem unreife Lymphozyten sind nicht in der Lage Asparagin selbst herzustellen (PIATKOWSKA-JAKUBAS *et al.*, 2008). Durch die Gabe von L-Asparaginase wird ihnen diese Aminosäure, die zum Wachstum und zur Proteinsynthese notwendig ist, entzogen. Die Folge ist ein Absterben Asparagin-abhängiger Tumorzellen. L-Asparaginase wird in der Regel sehr gut vertragen, jedoch kann es, da es sich um ein Fremdprotein handelt und die meisten Präparate weitere Fremdproteine enthalten, zur Bildung von Antikörpern kommen, die dann zu allergischen Reaktionen führen (MASETTI und PESSION, 2009). L-Asparaginase wird meist in einer Dosierung von 400 IU/kg oder 10000 IU/m² subkutan oder intramuskulär verabreicht. Die subkutane Applikation ist mit weniger allergischen Reaktionen verbunden als die intramuskuläre Gabe (VALERIUS *et al.*, 1999). L-Asparaginase wird sowohl über Urin als auch Kot eliminiert (CHUN *et al.*, 2007).

2.1.2.5 Prednisolon

Prednisolon ist ein Hormon, ein sog. kataboles Steroid, welches an zytoplasmatische Rezeptoren bindet und so die DNA-Synthese unterbindet (CZOCK *et al.*, 2005). Wird statt Prednisolon Prednison verabreicht, muss dieses in der Leber zur aktiven Form (Prednisolon) metabolisiert werden (JANN *et al.*, 1994). Die Tumor-wirksame Dosis von Prednisolon beträgt 2 mg/kg einmal täglich oral. Prednisolon wirkt in der angegebenen Dosis auch lympholytisch, kann also bei malignen Lymphomen zu einer, meist jedoch nur kurz dauernden, Remission führen (CHUN *et al.*, 2007). Auch kann die längerfristige Gabe von Prednisolon als Monotherapie zur Ausbildung einer Medikamentenresistenz (multi drug resistance) führen (PRICE *et al.*, 1991, KHANNA *et al.*, 1998). Die häufigen Nebenwirkungen dieser Dosis sind typisch für einen iatrogenen Hyperkortisolismus: Polyurie, Polydipsie sowie Polyphagie, Wesensveränderungen, Verlust von Muskelmasse und Hecheln (HUANG *et al.*, 1999, CHUN *et al.*, 2007).

2.2 Das maligne Lymphom des Hundes

Das maligne Lymphom ist meist ein Tumor der sekundären lymphatischen Organe, wie Lymphknoten, Leber und Milz (LEIFERT und MATUR, 1986), in anderen Fällen können auch weitere Gewebe, wie der Gastrointestinaltrakt, das zentrale Nervensystem (ZNS) oder die Haut betroffen sein (MADEWELL, 1985). Eine andere, kaum noch verwendete, Bezeichnung für diesen hämatopoetischen Tumor ist Lymphosarkom.

2.2.1 Ätiologie und Inzidenz

Jede Rasse kann an einem Lymphom erkranken, besonders häufig scheinen jedoch Golden Retriever betroffen zu sein. Es ist jedoch noch nicht klar, ob dies nur die Popularität dieser Rasse widerspiegelt oder eine echte Prädisposition darstellt (ROSENTHAL, 2001). In verschiedenen Studien waren vor allem Boxer, Bulldogge, Basset, Bernhardiner, Beagle, Pudel, Chow Chow, Deutscher Schäferhund und Scottish Terrier für diesen Tumor prädisponiert. Ein besonders geringes Risiko am Lymphom zu erkranken scheinen hingegen Dackel, Cocker Spaniel und Zwergspitze zu besitzen (DORN *et al.*, 1967, ROSENTHAL, 1984, COUTO, 1985, KELLER *et al.*, 1993, TESKE, 1994). Die jährliche Inzidenz des malignen Lymphoms wird mit 24 bis 114 Erkrankungen pro 100000 Hunde angegeben (DORN *et al.*, 1968, DORN *et al.*, 1970, DOBSON *et al.*, 2002). Bisher ist die Ätiologie des malignen Lymphoms unbekannt. In verschiedenen Studien wurde die Beteiligung von 2,4-Dichlorphenoxyazetat diskutiert. Die Studienergebnisse sind jedoch nicht schlüssig und sprechen eher dafür, dass dieses Herbizid nicht an der Ätiologie beteiligt ist (HAYES *et al.*, 1991 CARLO *et al.*, 1992). Es besteht keine Geschlechtsprädisposition, auch können Hunde jeden Alters erkranken, besonders häufig sind jedoch mittelalte bis ältere Tiere betroffen (PARODI *et al.*, 1968).

2.2.2 Klassifikation

Das maligne Lymphom kann anhand der anatomischen Form oder zytologisch-histologischer Kriterien sowie durch Immuntypisierung in verschiedene Formen bzw. Typen eingeteilt werden. Einige dieser Formen bzw. Typen besitzen prognostische Bedeutung, weshalb eine Klassifizierung sinnvoll ist (TESKE *et al.*, 1994).

2.2.2.1 Anatomische Formen

Das maligne Lymphom kann klinisch in verschiedene anatomische Formen unterteilt werden, je nachdem welche Organe primär von den Tumorzellen befallen sind. Es wird die multizentrische, mediastinale, gastrointestinale und extranodale Form unterschieden, obwohl manche Autoren auch das alimentäre Lymphom zu den extranodalen Formen zählen (RASSNICK *et al.*, 2009). Zu den extranodalen Formen zählen unter anderem ZNS-Lymphome, renale und kutane Lymphome.

2.2.2.1.1 Multizentrische Form

Die multizentrische Form ist dadurch gekennzeichnet, dass vor allem die peripheren Lymphknoten befallen sind. Sie ist mit ca. 80 % die häufigste Form beim Hund (MADEWELL *et al.*, 1987). Die Erkrankung beginnt meist in einem solitären Lymphknoten und breitet sich dann auf die gesamten Körperlymphknoten aus. Im weiteren Verlauf können dann auch Leber und Milz sowie das Knochenmark von Tumorzellen befallen werden. Anhand dieser Tumorausbreitung erfolgt das sogenannte Tumorstaging, die klinische Stadieneinteilung (siehe 2.2.3 Klinische Stadieneinteilung [Staging]).

Hunde mit der multizentrischen Form präsentieren sich meist mit einer generalisierten Lymphadenomegalie. Viele von ihnen zeigen außer dieser schmerzfreien Lymphknotenschwellung keine weiteren klinischen Symptome, sind also als Substage a einzustufen, bei ca. 20-40 % finden sich Gewichtsverlust, Fieber oder Anorexie (KELLER *et al.*, 1993, VAIL *et al.*, 1996). Bei ca. 10-20 % liegt eine paraneoplastische Hyperkalzämie vor (CHEW und MEUTEN, 1982, GREENLEE *et al.*, 1990). Ca. 37 % der Hunde leiden auch an sekundären Augenveränderungen. Am häufigsten findet sich eine anteriore Uveitis (KROHNE *et al.*, 1987). Im Umkehrschluss wurde bei 102 Hunden mit Uveitis in 17 % der Fälle ein malignes Lymphom diagnostiziert (MASSA *et al.*, 2002).

2.2.2.1.2 Mediastinale Form

Die mediastinale Form liegt in ca. 5 % der Lymphomfälle vor (MADEWELL *et al.*, 1987). Von ihr sind oft junge Tiere betroffen (DAY, 1997). Auch leiden ca. 40 % der Hunde an einer meist durch PTHrP (Parathormon-ähnliches Protein) induzierten Hyperkalzämie mit klinischen Symptomen wie Polyurie, Polydipsie oder muskulärer Schwäche sowie gastrointestinalen Symptomen (OGILVIE und MOORE, 1995). Manche Hunde werden auch mit Dyspnoe oder Husten durch den Masseneffekt des Tumors im Mediastinum vorgestellt. Im Röntgen findet sich bei betroffenen Hunden meist eine weichteildichte Masse im kranialen Mediastinum. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass auch Tiere mit einem multizentrischen Lymphom einen vergrößerten sternalen oder tracheobronchialen Lymphknoten oder röntgenologisch sichtbare Lungenparenchymveränderungen aufweisen können. In mehreren Studien wurde bei 60-75 % der Hunde durch das Lymphom bedingte Auffälligkeiten im Röntgen festgestellt (MACEWEN *et al.*, 1981, HAWKINS *et al.*, 1993, BLACKWOOD *et al.*, 1997, STARRAK *et al.*, 1997). Bei ca. 20 % der Hunde mit Lymphom lässt sich unter anderem eine Verbreiterung des kranialen Mediastinums nachweisen, welche mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (STARRAK *et al.*, 1997).

2.2.2.1.3 Gastrointestinale Form

Das gastrointestinale Lymphom ist beim Hund relativ selten (5-7 % aller Lymphom-Fälle) und mit einer schlechten Prognose verbunden (MADEWELL *et al.*, 1987). Nur ca. 5-7 % aller Magen-Darm-Tumoren beim Hund repräsentieren ein malignes Lymphom (PATNAIK *et al.*, 1977). Trotz Einsatz eines intensiven Doxorubicin-haltigen Kombinations-Chemotherapie-Protokolls liegen die Remissionsrate und mediane Überlebenszeit nur bei 56 % bzw. 77 Tagen (RASSNICK *et al.*, 2009). Die Hunde leiden meist an Gewichtsverlust, Lethargie und weiteren gastrointestinalen Symptomen wie Erbrechen, Durchfall oder Anorexie. In einer Studie von Rassnick und Kollegen wurden alle Hunde mit gastrointestinalem Lymphom in Substage b eingruppiert, d. h. sie zeigten eines oder in den meisten Fällen sogar mehrere der oben genannten Symptome (RASSNICK *et al.*, 2009).

2.2.2.1.4 Extranodale Formen

Eine der extranodalen Formen ist das kutane Lymphom. Hier wird zwischen epitheliotropen T-Zell- und nicht-epitheliotropen oder dermalen B-Zell-Lymphomen unterschieden. Epitheliotrope Lymphome werden häufiger diagnostiziert als dermale Lymphome, stellen aber insgesamt gesehen einen sehr seltenen Tumor dar und können anhand der humanen Klassifizierung in Mycosis fungoides, pagetoide Retikulose und Sezary-Syndrom unterteilt werden (SCOTT, 2001, CAMPBELL, 2004, GROSS *et al.*, 2005). Betroffene Hunde werden meist wegen chronischer Dermatitis oder nodulären Hautveränderungen vorgestellt, sekundär können auch innere Organe und Lymphknoten befallen werden (MORRISON, 2001). Die Prognose für kutane epitheliotrope Lymphome ist generell schlecht (FONTAINE *et al.*, 2009).

Eine weitere extranodale Form ist das ZNS-Lymphom. Es ist sehr selten und kann sowohl primär als auch als metastatische Beteiligung bei einem systemischen Lymphom auftreten (COUTO *et al.*, 1984, VAIL und YOUNG, 2007). Betroffene Tiere zeigen unter anderem Krampfanfälle, sollte das Großhirn betroffen sein. Bei Patienten mit Rückenmarksbeteiligung entsprechen die klinisch-neurologischen Symptome der Lokalisation des Tumors. In seltenen Fällen sind periphere Nerven beteiligt (ROSIN, 1982, COUTO *et al.*, 1984). Bei fast allen Tieren jedoch sprechen die neurologischen Symptome für ein multifokales Geschehen (COUTO *et al.*, 1984). Das Ansprechen auf eine Therapie ist meist schlecht und meist nur von kurzer Dauer (COUTO *et al.*, 1984). In fast allen Fällen ist die zytologische Liquoruntersuchung diagnostisch für ein malignes Lymphom (COUTO *et al.*, 1984).

2.2.2.2 Immuntypisierung und histologische Einteilung

Ca. 70 % der Lymphome gehören zum B-Zell-Immunphänotyp, ca. 20-25 % sind T-Zell-Lymphome (TESKE *et al.*, 1994, RUSLANDER *et al.*, 1997). Selten können weder B- noch T-Zell-Oberflächenmarker nachgewiesen werden. Diese Lymphome werden als Null-Zell-Typ bezeichnet (FAN, 2003). T-Zell-Lymphome verhalten sich klinisch meist aggressiver als B-Zell-Lymphome und ihre Therapie resultiert in geringeren Remissionsraten und kürzeren Überlebenszeiten (GREENLEE *et al.*, 1990, RUSLANDER *et al.*, 1997). Die meisten mediastinalen Lymphome gehören zum T-Zell-Typ (VAIL *et al.*, 1996, RUSLANDER *et al.*, 1997).

Für die histologische Klassifikation können die Rappaport- oder Kieler-Klassifikation sowie das Schema des National Cancer Institute (NCI-Working Formulation) verwendet werden. Im Amerikanischen Raum ist das Schema des NCI am weitesten verbreitet. In der NCI-Working Formulation werden die Tumoren anhand des mitotischen Index und des Zelltyps in niedriggradig (,low-grade‘), mittelgradig (,intermediate-grade‘) und hochgradig (,high-grade‘) eingeteilt (Tabelle 1) (WORKING FORMULATION, 1982). Hochgradige Tumore entwickeln sich meist sehr schnell progressiv und können in B- und T-Zell-Lymphome eingeteilt werden. Niedriggradige Lymphome sind meist vom B-Zell-Typ und verhalten sich klinisch weniger aggressiv (MORRISON, 2005).

Low-grade	<ul style="list-style-type: none">• kleinzellig lymphozytär• follikulär kleinzellig-gekerbt• follikulär gemischt kleinzellig-gekerbt und großzellig
Intermediate-grade	<ul style="list-style-type: none">• follikulär großzellig• diffus kleinzellig-gekerbt• diffus gemischt kleinzellig und großzellig• diffus großzellig, gekerbt oder nicht gekerbt
High-grade	<ul style="list-style-type: none">• großzellig immunoblastisch• lymphoblastisch• kleinzellig nicht-gekerbt (Burkitt- und nicht Burkitt-Lymphome)

Tabelle 1: Histologische Klassifikation des malignen Lymphoms anhand der NCI-Working Formulation(WORKING FORMULATION, 1982).

Die Rappaport-Klassifikation und das Kieler-Schema sind bereits veraltet, wobei eine modifizierte Version des Kieler-Schemas in Europa noch häufiger verwendet wird (MORRISON, 2005). Im Jahre 2002 wurde ein neu überarbeitetes Klassifikationsschema veröffentlicht, das sog. REAL-System (Revised European American Lymphoma System). Es kombiniert Morphologie, Immunphänotyp und Genotyp, um lymphatische Tumoren zu charakterisieren. Es nimmt Rücksicht auf den histogenetischen Ursprung und das biologische Verhalten, verzichtet jedoch auf die Einteilung in niedriggradig und hochgradig wie die NCI-Working Formulation. Daher wird es klinisch kaum angewandt (VALLI *et al.*, 2002).

Zusätzlich zu den typischen Non-Hodgkin-Lymphomen gibt es beim Hund noch weitere Subtypen, die jedoch selten vorkommen. Allerdings wird die Gruppe der sogenannten indolenten Lymphome zunehmend mehr und mehr beim Hund beschrieben. Dieser Typ von Lymphom findet sich am häufigsten in Milz und peripheren Lymphknoten und kann nur histologisch sicher diagnostiziert werden. Betroffene Hunde sind klinisch meist unauffällig. Histologisch werden vier Typen unterschieden: Randzonen-Lymphom, follikuläres Lymphom, Mantel-Zell-Lymphom und noduläres

T-Zell-Zonen-Lymphom. B-Zell-Lymphome überwiegen bei diesem Subtyp. Sie verhalten sich klinisch meist nicht progressiv und betroffene Hunde zeichnen sich durch lange Überlebenszeiten aus (VALLI *et al.*, 2006).

2.2.3 Klinische Stadieneinteilung (Staging)

Beim Staging wird die klinische Ausbreitung des Tumors im Patienten evaluiert. Das maligne Lymphom des Hundes wird klassischerweise in Stadium I-V eingeteilt (Tabelle 2). Zusätzlich werden noch das sog. Substage a und b unterschieden. Bei Substage a sind die Tiere frei von klinischen Symptome, bei Substage b zeigen sie Symptome wie z. B. Anorexie, Fieber, Apathie, Lethargie, Erbrechen oder Durchfall. Auch mit einer paraneoplastischen Hyperkalzämie werden die Tiere in Substage b eingeteilt. Die Stadieneinteilung erfolgt nach den Vorgaben der World Health Organisation (OWEN, 1980).

Stadium I	ein Lymphknoten neoplastisch verändert
Stadium II	mehrere regionäre Lymphknoten betroffen
Stadium III	generalisierte Lymphknotenvergrößerung
Stadium IV	Leber oder Milz (\pm Lnn.) betroffen
Stadium V	Knochenmark, peripheres Blut, andere Organe betroffen
Eine Unterteilung der einzelnen Stadien in Substage a und b erfolgt entsprechend dem Allgemeinbefinden; Substage a bei ungestörtem, b bei gestörtem Allgemeinbefinden oder paraneoplastischer Hyperkalzämie.	

Tabelle 2: Stadieneinteilung des kaninen malignen Lymphoms nach WHO (OWEN, 1980).

2.2.4 Diagnose

Die Diagnose eines malignen Lymphoms kann sowohl zytologisch als auch histologisch erfolgen. Anhand der Histologie kann auch gleichzeitig eine Klassifizierung des Lymphoms mittels der NCI-Working Formulation oder eines anderen Schemas vorgenommen werden. Zytologisch sind beim Hund die meisten hochgradigen Lymphome sicher zu diagnostizieren, bei den mittelgradigen und niedriggradigen Subtypen ist jedoch eine histologische Untersuchung notwendig (DUNCAN und PRASSE, 1979, CHUN *et al.*, 2007, VAIL und YOUNG, 2007). Eine Lymphknotenzytologie bei vergrößerten Lymphknoten ist ein relativ sicheres Diagnostikum um ein high-grade Lymphom zu diagnostizieren, hierbei sollten jedoch Lymphknoten, die oft reaktiv verändert sind, wie z. B. die Mandibularlymphknoten, gemieden werden (HIRSCHBERGER, 1994, COWELL *et al.*, 2003, DICKINSON, 2008, SAPIERZYNSKI und MICUN, 2009). Aber nicht nur anhand von Feinnadelaspiraten aus peripheren Lymphknoten kann eine zytologische Diagnose gestellt werden, auch anhand von Milz- oder Leberaspiraten kann in einigen Fällen eine sichere Diagnose erfolgen (CHRISTOPHER, 2003, WANG *et al.*, 2004, BALLEGEER *et al.*, 2007). Für eine histologische Diagnose sollte am Besten der gesamte Lymphknoten inklusive Kapsel eingesandt werden; bei Organen wie Leber, Milz oder Niere genügt eine kleinere Probe (DICKINSON, 2008). Sollte auch die Histologie ein unschlüssiges Ergebnis liefern, kann mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf Klonalität des Antigen-Rezeptors untersucht werden (PARR = PCR for antigen receptor rearrangement). Hiermit kann nicht nur die Klonalität der Lymphozyten nachgewiesen werden, auch kann gleichzeitig zwischen B- und T-Zell-Lymphom unterschieden werden (KELLER *et al.*, 2004).

2.2.5 Prognostische Faktoren und Prognose

Die Prognose beim malignen Lymphom hängt von einer ganzen Reihe von Faktoren ab. Dazu gehören unter anderem die anatomische Form, das klinische Stadium, das Substage, die histologische Klassifizierung, der Immunphänotyp, die Vorbehandlung mit Zytostatika oder Kortikosteroiden und die Entwicklung einer Medikamentenresistenz (MDR= multi drug resistance), die Proliferationsrate des Tumors, zusätzliche medizinische Probleme oder paraneoplastische Syndrome, wie z. B. Hyperkalzämie, Gewichtsverlust oder Leberinsuffizienz und möglicherweise auch das Geschlecht (MACEWEN *et al.*, 1981, COTTER und GOLDSTEIN, 1983, CARTER *et al.*, 1987, POSTORINO *et al.*, 1989, GREENLEE *et al.*, 1990, ROSENBERG *et al.*, 1991, KELLER *et al.*, 1993, TESKE *et al.*, 1994, BERGMAN *et al.*, 1996, LEE *et al.*, 1996, VAIL *et al.*, 1996, RUSLANDER *et al.*, 1997, STARRAK *et al.*, 1997, KIUPEL *et al.*, 1998, KIUPEL *et al.*, 1999, DOBSON *et al.*, 2001, JAGIELSKI *et al.*, 2002). Einer der wichtigsten prognostischen Faktoren beim malignen Lymphom ist das sog. Substage. Hunde mit Substage b, also Tiere mit Allgemeinsymptomen, haben eine signifikant schlechtere Prognose als Hunde ohne klinische Symptome (Substage a) (KELLER *et al.*, 1993). Zusätzlich ist es auch der Faktor, der sehr einfach nur durch die Anamneseerhebung zu eruieren ist. Ein weiterer wichtiger Faktor ist der Immunphänotyp. T-Zell-Lymphome, bei denen häufiger eine paraneoplastische Hyperkalzämie anzutreffen ist, haben eine schlechtere Prognose (GREENLEE *et al.*, 1990, KELLER *et al.*, 1993, RUSLANDER *et al.*, 1997, KIUPEL *et al.*, 1999, DOBSON *et al.*, 2001). Auch bestimmte Lokalisationen des Lymphoms (ZNS- (COUTO *et al.*, 1984), kutane epitheliotrope (FONTAINE *et al.*, 2009) und mediastinale Form (STARRAK *et al.*, 1997, RASSNICK *et al.*, 2009)) besitzen eine schlechtere Prognose. Der Einfluss des klinischen Stadiums auf die Prognose wird kontrovers diskutiert. In neueren Studien konnte kein statistisch signifikanter Einfluss des klinischen Stadiums auf die Prognose gezeigt werden (DOBSON *et al.*, 2001, LANA *et al.*, 2006, FLORY *et al.*, 2007). Hunde, die unter Therapie in komplette Remission gehen, zeigen deutlich längere Überlebenszeiten, als Hunde die nur eine partielle Remission oder stabile Erkrankung erreichten. Hunde, die auch unter Therapie ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung zeigen, besitzen die schlechteste Prognose mit den kürzesten Überlebenszeiten (MOORE *et al.*, 2001, GARRETT *et al.*, 2002, SIMON *et al.*, 2006). Bei den histologischen Formen verhalten sich die hochgradigen Lymphome aggressiver als die niedriggradigen (NCI Working Formulation; MORRISON, 2005). Auch sind die histologischen Subtypen des sog. indolenten Lymphoms meist mit sehr langen Überlebenszeiten und somit einer guten Prognose assoziiert (VALLI *et al.*, 2006). Auch die Evaluierung der Proliferationsrate des Lymphoms mittels AgNORs (argyrophil nucleolar organizer regions) kann beim malignen Lymphom von prognostischer Relevanz sein. So korrelierte eine längere Überlebenszeit mit einer größeren mittleren AgNOR-Fläche, einer absolut größeren AgNOR-Fläche, einem kürzeren Abstand zwischen zwei AgNORs und einem kleineren Verhältnis von AgNOR-Fläche zum Nukleus (KIUPEL *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu den AgNORs war die Auswertung der PCNA-positiven Zellen (PCNA = proliferating cell nuclear antigen) nicht von prognostischer Bedeutung (KIUPEL *et al.*, 1998). Bei den labordiagnostischen Parametern ist außer einer Hyperkalzämie auch eine Anämie und eine Thrombozytopenie mit einer schlechteren Prognose behaftet (KELLER *et al.*, 1993, ZEMANN *et al.*, 1998, MOORE *et al.*, 2001, ABBO und LUCROY, 2007). Im Gegensatz dazu war in einer Studie eine Thrombozytopenie vor Behandlungsbeginn sogar mit längeren Überlebenszeiten assoziiert (GARRETT *et al.*, 2002).

2.2.6 Therapie

Da das maligne Lymphom eine disseminierte Tumorerkrankung darstellt, und hämolymphatische Neoplasien vielfach sehr sensibel auf Chemotherapeutika reagieren, kann es am besten mit einer systemischen Chemotherapie behandelt werden (MACEWEN *et al.*, 1981, COTTER und GOLDSTEIN, 1983, CARTER *et al.*, 1987, MOORE *et al.*, 2001, GARRETT *et al.*, 2002, SIMON *et*

al., 2006). Lymphom-Zellen reagieren sensibel auf Zytostatika, wie z. B. Doxorubicin, Cyclophosphamid und Vincristin.

2.2.6.1 Mono-Chemotherapie-Protokolle

Das effektivste Medikament zur Behandlung des malignen Lymphoms als Monotherapie ist Doxorubicin. Es ist das einzige Medikament, bei dem mit einer Monotherapie lang dauernde Remissionen beim malignen Lymphom erreicht werden können (VAIL und YOUNG, 2007). Die komplette Remissionsrate in einer Studie lag bei 77 % und die mediane Remissionszeit bei ca. 6,5 Monaten (PAGE *et al.*, 1992). In einer weiteren Studie lagen die Remissionsrate bei 76 % und die mediane Überlebenszeit bei 9 Monaten (CARTER *et al.*, 1987). Auch Mitoxantron wurde bereits als Monotherapie eingesetzt. Die komplette Remissionsrate lag bei 26 %, die Gesamt-Remissionsrate (komplette plus partielle Remissionsrate) bei 41 % (MOORE *et al.*, 1994). Im Gegensatz zur Therapie mit Doxorubicin ist diese Erfolgsrate deutlich geringer. Auch die wöchentliche niedrig dosierte Gabe von Doxorubicin wurde gut toleriert, war jedoch generell ineffektiv zur Therapie des malignen Lymphoms (OGILVIE *et al.*, 1991). Auch Lomustin, ein Alkylanz, wurde beim multizentrischen Lymphom als Monotherapie eingesetzt. Von den 17 behandelten Hunden zeigten sechs eine komplette, drei eine partielle Remission. Die mediane Überlebenszeit lag jedoch bei nur 111,2 Tagen. Somit scheint Lomustin nicht als Primärtherapie für das multizentrische maligne Lymphom geeignet zu sein (SAUERBREY *et al.*, 2007).

2.2.6.2 Kombinations-Chemotherapie-Protokolle

Bei den Kombinations-Chemotherapie-Protokollen unterscheidet man Doxorubicin-haltige und nicht Doxorubicin-haltige Protokolle. Das Ziel einer Kombinations-Chemotherapie ist, dass so viele Tumorzellen wie möglich abgetötet, Nebenwirkungen auf ein Minimum reduziert werden und durch die Gabe verschiedener Medikamente einer Medikamentenresistenz der Tumorzellen vorgebeugt wird (CHUN *et al.*, 2007). Bei der Therapie des kaninen malignen Lymphoms können mit Doxorubicin-haltigen Kombinations-Chemotherapie-Protokollen Remissionsraten zwischen 76 % und 92 % und mediane Überlebenszeiten von einem Jahr erreicht werden (MOORE *et al.*, 2001, GARRETT *et al.*, 2002, SIMON *et al.*, 2006). Moore und Kollegen erreichten eine komplette Remissionsrate von 68 %, Simon und Kollegen eine von 76,3 % (MOORE *et al.*, 2001, SIMON *et al.*, 2006). Zwei weitere Studien berichteten von Remissionsraten von 67,7 %, 71,2 % und 92,3 % (PIEK *et al.*, 1999, GARRETT *et al.*, 2002). Doxorubicin-freie Protokolle enthalten meist verschiedene Alkylanzien, wie z. B. Cyclophosphamid und Chlorambucil, und andere Zytostatika, wie Vincristin oder Metothrexat, sind oft kostengünstiger und weniger Zeit-intensiv als Doxorubicin-haltige Protokolle (MACEWEN *et al.*, 1981, COTTER und GOLDSTEIN, 1983, CARTER *et al.*, 1987). Die Remissionsraten sind mit Doxorubicin-haltigen Protokollen vergleichbar und reichen von 70 %-90 %, allerdings liegen die medianen Überlebenszeiten mit ca. 6 bis 7,5 Monaten deutlich darunter (MACEWEN *et al.*, 1981, COTTER und GOLDSTEIN, 1983, CARTER *et al.*, 1987).

2.3 Dosis-intensivierende Protokolle – Vergleich zur Humanmedizin

In der Tiermedizin wird überwiegend das klassische Kombinations-Chemotherapie-Protokoll (CHOP-Protokoll: C für Cyclophosphamid, H für Hydroxy-Daunorubicin = Doxorubicin, O für Oncovin = Vincristin und P für Prednisolon) bestehend aus Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin und Prednisolon zur Therapie des malignen Lymphoms eingesetzt (MOORE *et al.*, 2001, GARRETT *et al.*, 2002, SIMON *et al.*, 2006, CHUN, 2009). Dieses Protokoll wurde aus der Humanmedizin übernommen, wo es bereits seit Jahrzehnten zur Therapie von intermediate und high-grade Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt wird (FISHER *et al.*, 1987, FISHER *et al.*, 1993, JÄGER *et al.* 1994). Im Unterschied zur Humanmedizin wird in der Tiermedizin mit nur etwa 2/3 der

ursprünglichen Dosis der einzelnen Medikamente und auch nur selten mit Kombinationen gearbeitet. D. h. in der Tiermedizin werden niedrigere Einzeldosen und die einzelnen Medikamente nacheinander statt simultan appliziert (MOORE *et al.*, 2001, GARRETT *et al.*, 2002, SIMON *et al.*, 2006, CHUN, 2009). Ein Nachteil bei der gleichzeitigen Gabe von Zytostatika kann ihre überlappende Toxizität, wie z. B. ihre myelosuppressive Wirkung sein. Wie in einer Studie von Bailey und Kollegen gezeigt wurde, konnten Carboplatin und Doxorubicin zur Therapie eines appendikulären Osteosarkoms bei gleichzeitiger Gabe nur in deutlich reduzierten Dosen appliziert werden. Statt 30 mg/m² bei Doxorubicin-Monotherapie und 300 mg/m² bei Carboplatin-Monotherapie konnten den Patienten nur 15 mg/m² bzw. 175 mg/m², ohne bedrohliche Zytopenien auszulösen, zeitgleich verabreicht werden (BAILEY *et al.*, 2003). Auch gibt es in der Tiermedizin nur eine Studie zu einem Dosis-intensivierenden Protokoll zur Behandlung des kaninen malignen Lymphoms. Die so therapierten Hunde erhielten anschließend eine autologe Knochenmarktransplantation. Die mediane Remissionszeit betrug 26,6 Wochen. Allerdings wurden Hunde mit Knochenmarkbefall und somit einer bereits schlechteren Prognose von dieser Studie ausgeschlossen (FRIMBERGER *et al.*, 2006). In einer weiteren Studie konnte bei Hunden mit malignem Lymphom unter Chemotherapie kein Einfluss von Dosisreduktion oder Therapieverzögerung auf die Dauer der ersten Remission gefunden werden. Allerdings war bei Hunden, die Grad III oder Grad IV Neutropenien zeigten, die Remissionszeit signifikant verlängert (VAUGHAN *et al.*, 2007). Die wöchentliche Applikation von Doxorubicin bei Hunden mit malignem Lymphom in einer reduzierten Dosis (10 mg/m², statt alle 3 Wochen 30 mg/m²) verursachte zwar deutlich weniger Nebenwirkungen, v. a. weniger Zytopenien, allerdings zeigten kaum Hunde eine komplette Remission (OGILVIE *et al.*, 1991). In dieser Studie blieb zwar die Summationsdosis gleich, jedoch war die Dosis-Intensität zum Zeitpunkt der Applikation deutlich verringert. Eine sehr große inter-individuelle Dosisvariation wurde auch bei Hunden beobachtet, die mit Vinblastin gegen Mastzelltumoren behandelt wurden. Die Dosierung von Vinblastin in dieser Studie reichte von 2 mg/m² bis 3 mg/m². Die empfohlene Dosierung für Vinblastin sind 2 mg/m² (VICKERY *et al.*, 2008). Diese Variabilität konnte auch in einer weiteren Studie gezeigt werden. Hier wurden Hunde mit Mitoxantron in verschiedenen Dosierungen therapiert. Die empfohlene Standarddosierung liegt bei 5 mg/m²; in dieser Studie wurden die Hunde jedoch mit bis zu 6,5 mg/m² therapiert. Obwohl es auch hier zu Toxizitäten kam, so tolerierten doch einige Individuen diese im Vergleich deutlich erhöhte Dosis ohne Probleme (OGILVIE *et al.*, 1994). Beim Menschen sind Dosis-intensivierende Protokolle zur Therapie von soliden Weichteilsarkomen beschrieben. Die so erreichten Dosisintensitäten von 1,5 im Vergleich zur Monotherapie von 1 führten zu einer Verdoppelung der Remissionsrate (LEYVRAZ *et al.*, 1998, BARISTA *et al.*, 2000). In der Tiermedizin ist ein Dosis-intensivierendes Protokoll zur Behandlung von Hämangiosarkomen und Weichteilsarkomen beschrieben. Hier wurden Doxorubicin (30 mg/m²) und Ifosfamid (375 mg/m²) mit einer wöchentlichen Dosisintensität von mindestens >1,6 verabreicht. Die Dosisintensität bei einer Monotherapie läge bei 1. Die Remissionsraten in dieser Studie unterschieden sich jedoch nicht von denen des Monotherapieprotokolls mit Doxorubicin in der historischen Kontrollgruppe (PAYNE *et al.*, 2003).

III. Publikation

MS ID#: **VETRECORD**/2009/034587

MS TITLE: A 13-week Dose Intensifying Simultaneous Combination Chemotherapy (DISC) Protocol for Malignant Lymphoma in Dogs: 21 Cases

Dear Dr Zenker,

I am pleased to inform you that the above manuscript has been accepted for publication in Veterinary Record.

To view the reviewers' reports on the paper, please visit submit-veterinaryrecord.bvapublications.com, log in and enter your Author Area, and click on the 'Manuscripts with Decisions' queue. Then, click on 'Reviews'.

To download copyright forms for the article, please click on 'Assignment of Copyright' in the General Information section of your Author Area. Please note that we will be unable to publish your article until we have received a signed assignment of copyright from you.

You can upload your signed copyright form by scanning it and saving it to your hard disk as a JPEG or PDF. Then return to your Author Area, go to the 'Manuscripts with Decisions' queue and click on 'Upload Signed Copyright Form'. Follow the instructions and use the 'Browse' button to find and select the electronic copyright form on your hard disk.

Alternatively, you can send the signed copyright form by post to the address below.

If you have any photographs that would be suitable as a front cover picture please send them to us by e-mail to manuscripts@bva-edit.co.uk, with the e-mail title 'Front cover' and the manuscript reference number. Images need to be at a resolution of 300 dpi at around 20 cm width; we can accept most types of photo file formats, including JPEG, TIFF and EPS.

If you have any queries at this stage please contact us at manuscripts@bva-edit.co.uk.

Yours sincerely,

Suzanne Jarvis
Deputy Editor

Veterinary Record
BMJ Group
BMA House
Tavistock Square
London WC1H 9JR, Phone:+44 (0)20 7387 4409
Fax:+44 (0)20 7383 6418
manuscripts@bva-edit.co.uk

A 13-week Dose Intensifying Simultaneous Combination Chemotherapy (DISC) Protocol for Malignant Lymphoma in Dogs: 21 Cases

Isabella Zenker, DVM; Kristina Meichner, DVM; Katja Steinle, DVM; Martin Kessler, DVM, DECVIM (Oncology); Johannes Hirschberger, DVM, PhD, DECVIM (Internal Medicine & Oncology)

Abstract

The objective of this prospective study was to record toxicity profile of a Dose Intensifying Simultaneous Chemotherapy (DISC) protocol for dogs with lymphoma. In addition, remission rates and duration were evaluated. Twenty-one dogs were enrolled. Diagnosis was based on cytology or histology. The DISC protocol is a 13-week maintenance free protocol. L-Asparaginase (400 IU/kg SC) was administered on day 1, followed by weekly simultaneous administration of vincristine (0.7 mg/m² IV = 100%), cyclophosphamide (200 mg/m² IV = 100%), and doxorubicin (30 mg/m² IV = 100%) at a starting dose level of 33%. Dose levels were given twice and then increased by 5-7% if \leq grade I toxicities were seen to a maximum dose level of 60%. Two dogs experienced a grade IV toxicity each (asymptomatic neutropenia; sepsis). Two asymptomatic grade III thrombocytopenic and 1 neutropenic episodes were recorded. Other toxic events were infrequent and mild. Only 1 dog required hospitalization for less than 48 hours. Response distribution was as follows: Complete remission 17/21 (80.9%); partial remission 1/21 (4.8%); stable disease 2/21 (9.5%); and progressive disease 1/21 (4.8%). Median complete remission duration was 294 days. Toxicity profile, remission rates, and duration compare favourably to most other multidrug chemotherapy protocols.

Malignant Lymphoma is the most common haematopoietic neoplasia in dogs with an estimated annual incidence of 24 to 114 per 100,000 dogs (Dorn and others 1968, Dorn and others 1970, Dobson and others 2002). Treatment is quite successful with a variety of combination chemotherapy protocols. Most protocols consist of an induction and a maintenance phase. A recent study showed a comparable efficacy and toxicity profile of a maintenance free 12-week combination chemotherapy protocol (L-Asparaginase, vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, prednisolone; Simon and others 2006). In human medicine, and rarely in veterinary medicine dose intensifying protocols with or without autologous bone marrow transplantations are used to treat non-Hodgkin's lymphoma (Freedman and others 1997, Ribrag and others 1998, Itoh and others 2000, Pfreundschuh and others 2001, Kelly and others 2002, Frimberger and others 2006). In Veterinary Medicine only one study with a dose intensifying chemotherapy protocol followed by autologous bone marrow transplantation for malignant lymphoma in dogs is published (Frimberger and others 2006). Median remission time in this study was 26.6 weeks. However, dogs with bone marrow infiltration were excluded from the study.

The combined administration of drugs effective against one tumour type with different mechanisms of actions is thought to prevent (multi-)drug resistance by killing tumour cells more effectively than administration of just one drug. Dogs treated with multidrug protocols containing vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin generally have longer survival times than dogs treated with doxorubicin-free protocols (Ettinger 2003). Single agent therapy is thought to increase the likelihood of (multi-)drug resistance compared to combination of different drugs. A disadvantage in combining or simultaneous administration of multiple drugs is overlap of their toxicity profiles. As demonstrated in a study by Bailey and others (2003) drugs with the same dose limiting toxicity such as myelosuppression could only be administered at a considerably reduced dose compared to single agent therapy. In this study, dogs were treated with a combination protocol consisting of doxorubicin (15 mg/m²) and carboplatin (175 mg/m²) for appendicular osteosarcoma.

The primary aim of this pilot study was to document the toxicity profile and gather preliminary data on remission rate and duration of a simultaneous dose intensifying combination chemotherapy

protocol, called the DISC protocol. To the author's knowledge no study regarding a dose intensifying chemotherapy protocol with simultaneous application of vincristine, cyclophosphamide and doxorubicin exists.

Material and Methods

Patients

Dogs presented with a histologic or cytologic diagnosis of malignant lymphoma of any stage or anatomic form were eligible for this study. Other criteria for inclusion were written owner consent. The owner consent was approved by the ethics committee to assure adequate owner education regarding standard treatment for lymphoma in dogs. Owners were free to withdraw their consent any time during the study without giving any reasons. Dogs that didn't experience a remission or developed progressive disease during the study period were withdrawn from the study and owners were offered treatment with a standard chemotherapy protocol (Simon and others 2006). Dogs previously treated with chemotherapy were excluded from the study.

Pre-treatment Evaluation

Pre-treatment evaluation consisted of a complete physical examination, haematology, biochemistry profile, urinalysis, thoracic and abdominal radiographs and abdominal ultrasound for all dogs. A bone marrow aspiration cytology was done according to the attending clinician, or if bi- or pancytopenias were present and no circulating neoplastic lymphocytes on a peripheral blood smear were seen. Tumours were measured either directly or via radiographic or ultrasonographic imaging. Clinical staging was performed according to the World's Health Organisation (WHO) clinical staging system for lymphoma in domestic animals with the alimentary form as an extranodal lymphoma and the mediastinal form assigned to stage V (Owen, 1980).

Chemotherapy Protocol and Patient Monitoring

With the DISC protocol three chemotherapeutic drugs, vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin were given simultaneously. Drug dosages defined as a 100% were as follows: vincristine 0.7 mg/m², cyclophosphamide 200 mg/m², and doxorubicin 30 mg/m². Treatment consisted of a 13-week dose intensifying simultaneous combination chemotherapy protocol (DISC protocol) starting with L-Asparaginase, followed by weekly simultaneous administration of vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisolone. The starting dose level was 33% of the previously defined 100% drug dosage and every dose level was administered for two consecutive treatments (table 1). If no or only minor toxicities (e.g. \leq grade I) were seen, dosage was increased by 5-7% to the next dose level to a maximum dose level of 60%. Dose levels were defined as follows: 33%, 40%, 45%, 50%, 55%, and 60%. Dose level was decreased if dogs showed grade III or IV toxicities during the dose intensifying phase of the protocol. Dexamethasone (0.2 mg/kg SC) was administered before treatment with L-Asparaginase. Furosemide (0.5 mg/kg q 12 h for 2 days PO) was given with every treatment except L-Asparaginase to prevent haemorrhagic cystitis. In addition, prednisolone (2 mg/kg q 24 h PO) was given for 3 consecutive days with all treatments. Prior to the next dose of chemotherapy, haematology was performed 7 days after each treatment. Serum biochemistry was performed routinely every third treatment, when dogs exhibited signs of toxicosis or other signs of concerns to the attending clinician. Tumour size was evaluated before each treatment by the attending clinician by direct measurement. When tumour was not amendable to direct measurement, it was performed via radiographic or ultrasonographic imaging every third treatment. After completing the DISC protocol dogs were rechecked every 8 to 10 weeks for remission status for at least two years.

In case of a relapse patients were treated with a previously published multidrug protocol (Simon and others, 2006) depending on owner's consent.

Assessment of Response to Treatment

Complete remission (CR) was defined as a 100% reduction in size of all measurable disease; a partial remission (PR) as >50% but <100% reduction in tumour size; and stable disease (SD) as <50% reduction, no reduction or <25% increase in size of all measurable disease. Progressive disease (PD) was defined as a >25% increase in size of all measurable disease or appearance of new lesions. Dogs that died or were euthanized while still in CR were recorded as relapse and included in the analysis.

Assessment of Toxicosis

Results of haematology as well as other clinical signs of toxicosis were recorded routinely 1 week after each treatment. Haematologic toxicities, such as neutropenia, thrombocytopenia, and anaemia, gastrointestinal toxicosis, or septic episodes were graded according to the Veterinary Co-Operative Oncology Group's common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) v1.0 (Veterinary Co-operative Oncology Group 2004) , and the number of toxicity episodes at each dose level and for each organ system were recorded separately for each dog.

Statistical analysis

All dogs treated with the DISC protocol were included in analyses of response rate and duration. Overall response rate was defined as the number of dogs with CR and PR divided by the number of dogs treated. CR or PR rate was defined as numbers of dogs with CR or PR divided by the number of dogs treated. Remission duration was defined as the time in days from which a dog first achieved CR or PR until relapse. Dogs still in CR at time of data analysis were censored from analysis of remission duration. Survival time was not calculated due to the small patient number and because most dogs

were treated with a variety of treatment protocols after relapse. Dogs that died or were euthanized in CR were regarded as if a relapse had occurred at this time point and were included in remission duration analysis rather than censoring them to give a definitive remission duration. Dogs still in complete remission at last contact with the owners or after two years were censored from analysis. Complete remission duration was calculated by Kaplan-Meier survival analysis. Statistical calculations were performed by a commercial statistical software package (SPSS.13).

Results

Patient Population

In this pilot-study between February 2006 and January 2007 21 dogs with newly diagnosed lymphoma were prospectively enrolled. Dogs were treated at the Clinic of Small Animal Medicine, University of Munich and the Small Animal Clinic in Hofheim. Dogs included belonged to 9 different breeds: Briard (n = 2), Canadian Shepherd, Beagle, Yorkshire Terrier, English Springer Spaniel, Golden Retriever, Rottweiler, and Schipperke, one dog each, and 9 additional mixed breed dogs. Median age was 7.3 years (Mean 7.1 years; range 1.8-12.4 years) and median weight was 27.8 kg (Mean 27.6 kg; range 6.8-50.8 kg). Eleven dogs were male (4 castrated) and 10 female (6 spayed). Five patients were pre-treated with corticosteroids for variable time periods. Mean prednisolone dose in those dogs was 2 mg/kg q 24 h PO (range 1-4 mg/kg q 24 h) and mean treatment duration 15.2 days (range 3-63 days). In four dogs lymphoma was diagnosed histologically; the remaining dogs were diagnosed by fine needle aspiration cytology. All lymphomas diagnosed were high grade lymphoblastic.

Clinical Staging

Ten dogs (47.6%) were classified as stage III, 6 (28.6%) as stage IV, and 5 (23.8%) as clinical stage V. Seventeen dogs (66.7%) were presented with the multicentric form, 2 dogs (9.5%) with the mediastinal form (Stage V), and 2 dogs (9.5%) suffered from alimentary lymphoma (stage V). Eleven individuals (52.4%) were substage a and 10 (47.6%) substage b. Two dogs with substage b presented in stage III, 5 in stage IV and 3 – 1 alimentary and 2 mediastinal – in stage V.

Laboratory Parameters

Four dogs were anaemic at initial examination. The packed cell volume in these dogs ranged from 24% to 28%. Five dogs were thrombocytopenic with platelet counts varying from 31,000 to 148,000/ μ l. One dog had circulating neoplastic lymphocytes in the peripheral blood smear; no bone marrow examination was done in this dog. The 2 dogs with mediastinal lymphoma showed ionized hypercalcaemia (1.73 and 1.94 mmol/l; reference range 1.15-1.45 mmol/l). One dog was diabetic before entering the study due to prolonged prednisolone treatment.

Toxicity Profile

After administration of L-Asparaginase, 2 dogs showed either a grade I or grade II neutropenia, and 2 dogs were thrombocytopenic, but 1 of the dogs was already thrombocytopenic (grade II) before treatment with L-Asparaginase and platelet counts were increased compared to pre-treatment values, so this thrombocytopenia was not considered a toxic event due to administration of L-Asparaginase. The other dog experienced a grade I thrombocytopenia. Two dogs showed a grade II and 1 dog a grade I anaemia, but 2 of these dogs were already anaemic before treatment with L-Asparaginase.

At dose level 33% 2 dogs exhibited a grade I and 1 a grade II gastrointestinal toxicosis consisting of inappetence, vomiting and mild diarrhoea; also 3 grade I neutropenic events and 1 grade I thrombocytopenia were recorded. Four dogs showed anaemia (3 grade I, 1 grade III). Three dogs developed episodes with fever and lethargy at dose level 33% with 2 dogs (1 grade I, 1 grade II) doing well on oral antibiotics and out-patient management. Both dogs showed no other signs of sepsis besides an elevated temperature, none was neutropenic or had a left shift on haematology. Owners were advised to check rectal temperature at home and it was within the reference range in both dogs the same evening. One febrile patient had to be hospitalized (grade IV), but could be discharged 3 days

later. The dog was febrile, lethargic, anorectic, and showed a left shift on haematology. The sepsis in this dog was due to a urinary tract infection with *Escherichia coli*.

At dose level 40% 3 grade I gastrointestinal events, anorexia and diarrhoea were observed. In addition, 4 grade I and 3 grade II neutropenic and 3 grade I anaemic events occurred.

At 45% a total of 20 toxic events occurred. One dog developed a grade I diarrhoea, 6 dogs a grade I, 2 a grade II, 1 a grade III, and 1 a grade IV neutropenia. Two grade I, 1 grade II, and 2 grade III thrombocytopenic events, and 4 grade I anaemias were recorded. All haematologic toxicities were asymptomatic.

At 50% 1 dog developed grade I vomiting, 1 grade I and 1 grade II neutropenia and 2 grade I anaemias were detected. One dog also experienced a grade I hair loss.

One dog showed a grade II diarrhoea at dose level 55%. Also at 55% occurred: five grade I, 2 grade II neutropenic, 3 grade I and 1 grade II anaemic events.

At dose level 60% only 1 grade I neutropenic as well as 1 grade I thrombocytopenic event were recorded.

Two dogs (dog 6 and 12), that were initially treated at dose level 50% required dose reductions to dose level 40% because of prolonged neutropenic episodes (grade II). Otherwise owners would have withdrawn their dogs from the study.

A summary of toxic events is given in table 2.

Treatment Response

Response distribution in the 21 patients was as follows: CR: 17 (80.9%), PR: 1 (4.8%), SD: 2 (9.5%), and PD: 1 (4.8%). Median complete remission duration was 294 days (range 68 to > 730 days). The

Kaplan-Meier remission analysis is presented in Figure 1. One dog in complete remission died during the protocol at day 78 due to gastric volvulus. While writing this article 2 of 21 dogs are still in their first CR. Most dogs achieving CR did so after the L-Asparaginase treatment. Only 3 of 17 dogs took 2 to 3 treatment cycles before attaining CR.

Treatment Course

Sixteen of the 21 dogs completed the 12-week chemotherapy protocol, while chemotherapy was discontinued in 4 dogs at different time points and 1 dog died. Four dogs were withdrawn from the study due to owner's request (relapse [n=1], toxicity [n=1], partial remission [n=1], euthanasia due to progressive disease [n=1]). Treatment discontinuation was due to tumour recurrence (n=1) after 6 treatment cycles at dose level 33%, lack of response in 2 dogs with SD after 2 and 5 treatment cycles, and toxicosis (n=1). This dog was withdrawn after developing severe sepsis and diabetic ketoacidosis following the second therapy cycle. One dog in CR died after 78 days having received 6 treatments due to gastric volvulus with a gastric foreign body. No necropsy was done. Treatment delay in this dog was due to bad owner compliance not because of side effects. Even though 16 dogs completed the DISC protocol, only 2 dogs achieved the intended dose level of 60%, 6 dogs achieved 55% and 8 the 50% dose level. Numbers of applications at each dosing level for every patient are shown in table 3. Most dogs took longer than 12 weeks to complete the DISC protocol, not only because to treatment delays due to side effects. Most of the time treatments delays were due to time constraints of owners and postponed appointments due to holidays. On average completion of the protocol took 16 weeks. In some dogs dose levels were not increased even though only grade I or no toxicity occurred due to owner's request. Otherwise owners would have withdrawn their dogs from the study. Most of those cases were among the first dogs treated with this novel protocol. In some cases the attending clinician didn't administer the next dose level, because the patient experienced a borderline grade I to II

toxicity. For example, a neutrophil count of 2,560/ μ l is still considered a grade I toxicity, but less than 2,500/ μ l is considered a grade II toxicity.

Discussion

Lymphoma in dogs is currently treated with combination chemotherapy protocols with remission rates ranging from 76%-92% and median survival times about a year (Garrett and others 2002). To the author's knowledge, no dose intensifying simultaneous chemotherapy protocol as the sole treatment for malignant lymphoma in dogs has been evaluated so far. The goal of this study was to record toxicity profile, remission rates, remission duration, and individual dose variation of such an approach. The hypothesis was that the DISC protocol is not more toxic than conventional combination chemotherapy protocols and remission rates are similar. 33% was chosen as the starting dose level since the combined doses of all 3 drugs administered simultaneously was the equivalent of 100% drug dose. With a starting dose level of 33% the cumulative dose intensity of the 3 drugs then was equal to the dose intensity of any single agent. The authors also felt that the risk of side effects due to overlapping toxicities at this starting dose level 67% below the maximum tolerated dose would be minor to negligible. Maximum dose of 60% in this protocol was determined by this special approach to dose intensification: The DISC protocol was designed as a 13-week maintenance free protocol and dose levels were administered twice prior to increasing the dosage to the next dose level. With all dose levels given twice for a total of 12 weeks and an increase of dosage in increments of 5%, maximum dose levels reached for this protocol were 60%.

Complete staging was not performed in all dogs treated. Bone marrow aspiration cytology was not examined in all dogs. Due to insufficient staging and small patient numbers, influence of stage on treatment outcome or toxicity was not evaluated.

Only one case of sepsis was observed with the DISC protocol, which occurred in a diabetic dog with a urinary tract infection. The dog had been pre-treated with high doses of prednisolone (2 mg/kg q12h PO) for 9 weeks before entering the study and had developed iatrogenic diabetes mellitus. The dog recovered uneventfully and was discharged from the hospital three days later. Dogs with diabetes mellitus or Cushing's disease are prone to secondary infections, especially urinary tract infections with

Escherichia coli (Hess and others 2000). It was suggested that this, and not heightened toxicity of the DISC protocol, caused the dog to become septic. Two other dogs with an elevated temperature, but without other clinical signs of sepsis or secondary infection, were managed on an out-patient basis with oral antibiotics. Owners were advised to check rectal temperature at home and it was within the reference range in both dogs the same evening. In these 2 cases it is not clear, whether they were truly febrile or just hyperthermic due to excitement or, for example, a prolonged car ride in the heat. The authors felt that these dogs were more likely hyperthermic than truly febrile, because no other signs for sepsis or infection were observed and rectal temperature was within the reference range in both dogs the same evening. Other than this septic episode only 1 grade IV toxicity occurred; an asymptomatic neutropenic event that required no further treatment.

The authors couldn't explain haematologic toxicities after administration of L-Asparaginase other than in patients already cytopenic prior to treatment. In these patients myelosuppression was regarded a paraneoplastic syndrome. Neutropenia after administration of L-Asparaginase has been described in patients treated simultaneously with vincristine and L-Asparaginase, but L-Asparaginase itself is not considered to be myelosuppressive (Northrup and others 2002).

Even though all patients received cyclophosphamide weekly, no dog developed signs of haemorrhagic cystitis. In addition, no treatment or toxicity related death occurred. Overall the toxicity level of the DISC protocol was acceptable and even less compared to conventional chemotherapy protocols (Myers and others 1997, Zemann and others 1998, Chun and others 2000, Moore and others 2001, Garrett and others 2002, MacDonald and others 2005, Simon and others 2006). In a study by Moore and others (2001) examining a discontinuous treatment protocol (VELCAP-S), drug dosages had to be reduced due to toxicity in 31 of 82 dogs, and three myelosuppressed septic dogs died. Five of 58 dogs receiving cyclophosphamide developed a sterile haemorrhagic cystitis. In contrast during this study no treatment or toxicity related death occurred, only one dog needed to be hospitalized, no dog developed a sterile haemorrhagic cystitis, and most toxicities were either mild (gastrointestinal signs) or asymptomatic (haematologic toxicities). No clinical cardiac toxicity after doxorubicin administration was observed. However, only a small number of dogs were treated at dose level 50% or higher and no

routine echocardiographic examinations or cardiac troponin measurements in these dogs were carried out. Therefore cardiac side effects due to doxorubicin administration cannot be completely excluded. Cumulative dose of doxorubicin was calculated for all dogs. Maximum cumulative dose of doxorubicin administered during the study was 170 mg/m². With a higher dose level than 60% or an increased starting dose level the cumulative dose of doxorubicin in individual dogs would be more than 180 mg/m². A heightened risk of chronic cardiac toxicity, such as development of dilated cardiomyopathy due to doxorubicin is described at cumulative doses of 180 mg/m² or higher (Mauldin and others 1992). In another study, doxorubicin was given weekly at 10 mg/m² and no higher incidence of cardiac events was recorded (Ogilvie and others 1991).

In this study the overall remission rate was 85.7% with a CR rate of 80.9%. CR rate was comparable or slightly lower than with other conventional doxorubicin containing protocols. Moore (2001) achieved a 68% CR rate, Simon (2006) a 76.3% CR rate, the two remaining studies had CR rates of 67.7%, 71.2 %, and 92.3% (Piek and others 1999, Garrett and others 2002). The slightly lower remission rates compared to some studies may be due to the fact that some of the dogs were withdrawn from the study before they could be treated with multiple doses. Another reason could be the development of multiple drug resistance after pre-treatment with prednisolone or the low-dose simultaneous approach used in the DISC protocol. Nevertheless, chemotherapy protocols with daily low-dose administration of, for example, cyclophosphamide (25 mg/m² per day) and etoposide (50 mg/m² per day) are used, in which increased incidence of multiple drug resistance has not been reported (Coleman and others 2008).

Median complete remission duration in this study was 294 days (range 78 to > 730 days). This compares favourably to conventional chemotherapy protocols with median remission times ranging from 140 to 385 days (Zemann and others 1998, Piek and others 1999, Chun and others 2000, Moore and others 2001, Garrett and others 2002, MacDonald and others 2005, Simon and others 2006).

The variation in individual dose tolerance was remarkable. Some dogs were not able to be treated at a dose level higher than 33% due to side effects. Therefore, the authors would not recommend a higher starting dose level than 33%. However, in some dogs dose levels could be increased to 50% or 55%

without clinically significant side effects; two dogs were even treated with a dose level 60% without any obvious side effects. This wide inter-individual dose range has been observed in dogs treated with vinblastine for mast cell tumours. Dose variation ranged from 2 mg/m² to 3 mg/m² with the recommended dosage for dogs being 2 mg/m² (Vickery and others 2008). This supports the hypothesis that dogs, specifically their bone marrow reserve exhibit a wide range in inter-individual dose tolerance.

Because only a small number of dogs was treated with the DISC protocol further studies are needed to evaluate the potentially beneficial effects of individual dose adjustment in polychemotherapy protocols. Furthermore, to justify their use, dose intensifying simultaneous chemotherapy protocols, such as the DISC protocol, should be associated with a definite survival benefit of at least a 25% prolonged remission time compared to conventional protocols to outweigh their disadvantages, e.g. higher costs and increased length of time needed for the simultaneous drug administration. Further studies evaluating a similar protocol consisting of a weekly dose escalation, also starting at 33% and with a maximum dose level of 65% are ongoing.

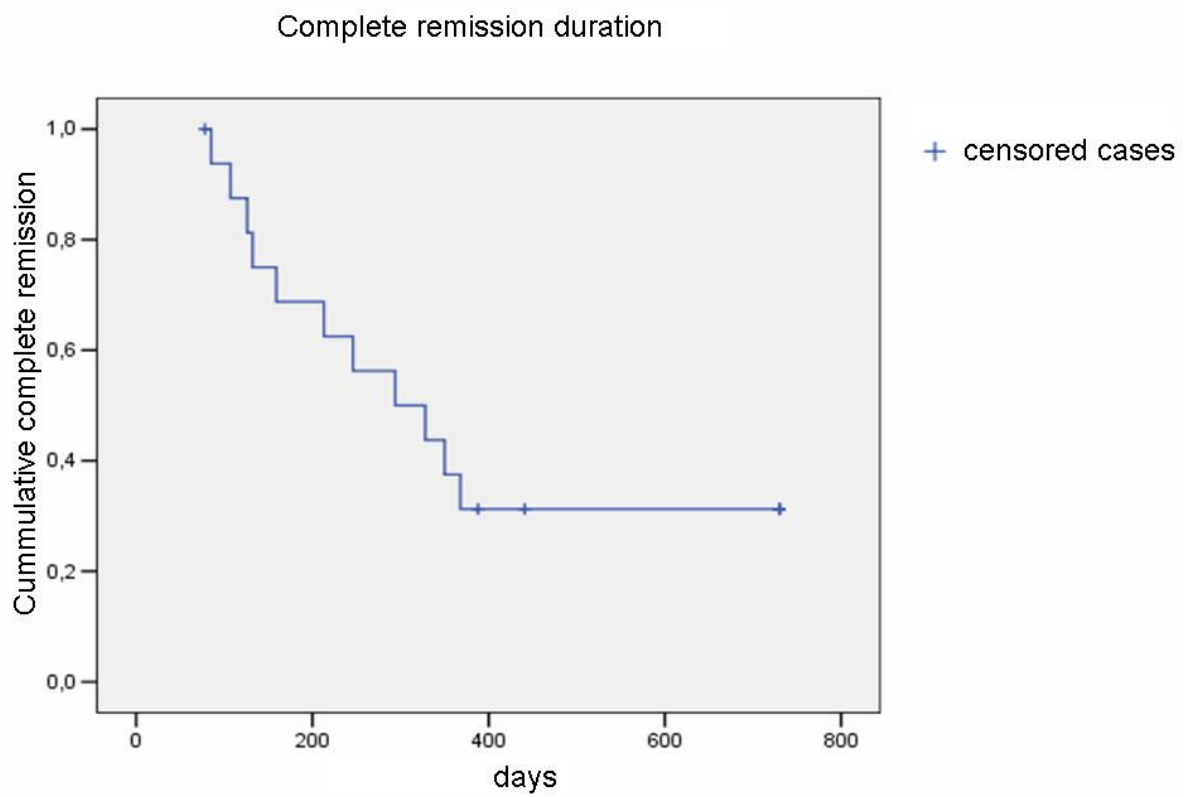


Figure 1: Kaplan-Meier analysis for dogs in complete remission

Drug	Dose	Week												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L-Asparaginase¹	400 IU/ kg SC	100%												
Vincristine	0.7 mg/m ² IV		33%	33%	40%	40%	45%	45%	50%	50%	55%	55%	60%	60%
Cyclophosphamide²	200 mg/m ² IV		33%	33%	40%	40%	45%	45%	50%	50%	55%	55%	60%	60%
Doxorubicin¹	30 mg/m ² IV*		33%	33%	40%	40%	45%	45%	50%	50%	55%	55%	60%	60%
Prednisolone	2 mg/kg q24 h PO for 3 consecutive days	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

IV: intravenously, IV*: intravenously over 20 minutes, PO: orally;

¹ pretreatment with dexamethasone 0.2 mg/kg SC or IV

² furosemide for 2 consecutive days 0.5 mg/kg q 12h PO

Table 1 Maintenance-free Dose Intensifying Simultaneous Chemotherapy (DISC)-protocol

Organ system	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
Gastrointestinal	7	2		
Neutropenia	21	9	1	1
Thrombocytopenia	5	1	2	
Anemia	16	3	1	
Fever/Sepsis	1	1		1
Hair loss	1			

Table 2: Number of toxicities according to organ system and grade occurring during administration of the DISC protocol

Dog	L-Asparaginase	33%	40%	45%	50%	55%	60%	Total
1	1	2	2	2	2	4		13
2	1	2	2	2	2	2	2	13
3	1	2	2	2	2	4		13
4	1	2	2	2	3	3		13
5	1	2	2	2	2	4		13
6	1	2	4	5	1			13
7	1	2	2	2	2	2	2	13
8	1	2						3
9	1	2	2	8				13
10	1	11	1					13
11	1	12						13
12	1	2	5	4	1			13
13	1	2	2	8				13
14	1	2	2	8				13
15	1	1						2

16	1	5	6	1				13
17	1	5						6
18	1	12						13
19	1	2	1					4
20	1	1						2
21	1	2	2	8				13
Total	21	75	37	54	15	19	4	225

Table 3 Number of treatments at each dose level for each patient and total number of treatments at each dose level

References

- BAILEY D., ERB H., WILLIAMS L., RUSLANDER D. & HAUCK M. (2003) Carboplatin and doxorubicin combination chemotherapy for the treatment of appendicular osteosarcoma in the dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17, 199-205
- CHUN R., GARRETT L.D. & VAIL D.M. (2000) Evaluation of a high-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14, 120-124
- COLEMAN M., MARTIN P., RUAN J., FURMAN R., NIESVIZKY R., ELSTROM R., GEORGE P., LEONARD J. & KAUFMANN T. (2008) Low-dose metronomic, multidrug therapy with the PEP-C oral combination chemotherapy regimen for mantle cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 49, 447-450
- DOBSON J.M., SAMUEL S., MILSTEIN H., ROGERS K. & WOOD J.L. (2002) Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice* 43, 240-246
- DORN C.R., TAYLOR D.O., SCHNEIDER R., HIBBARD H.H. & KLAUBER M.R. (1968) Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute* 40, 307-318
- DORN C.R., TAYLOR D.O. & SCHNEIDER R. (1970) The epidemiology of canine leukemia and lymphoma. *Bibliotheca Haematologica* 36, 403-415
- ETTINGER S.N. (2003) Principles of treatment for canine lymphoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 18, 92-97
- FREEDMAN A., NEUBERG D., MAUCH P., GRIBBEN J., SOIFFER R., ANDERSON K., ROBERTSON M., FISHER D.C., SCHLOSSMANN R., KROON M., RHUDA C., KUHLMAN C., RITZ J. & NADLER L. (1997) Cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone dose intensification with granulocyte colony-stimulating factor markedly depletes stem cell reserve for autologous bone marrow transplantation. *Blood* 90, 4996-5001

FRIMBERGER A.E., MOORE A.S., RASSNICK K.M., COTTER S.M., O'SULLIVAN J.L. & QUESENBERRY P.J. (2006) A combination chemotherapy protocol with dose intensification and autologous bone marrow transplant (VELCAP-HDC) for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 355-364

GARRETT L.D., THAMM D.H., CHUN R., DUDLEY R. & VAIL D.M. (2002) Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16, 704-709

HESS R.S., SAUNDERS H.M., VAN WINKLE T.J. & WARD C.R. (2000) Concurrent disorders in dogs with diabetes mellitus: 221 cases (1993-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217, 1166-1173

ITOH K., OHTSU T., WAKITA H., IGARASHI T., ISHIZAWA K., ONOZAWA Y., FUJII H., MINAMI H. & SASAKI Y. (2000) Dose-escalation study of CHOP with or without prophylactic G-CSF in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology* 11, 1241- 1247

KELLY K.M., HUTCHINSON R.J., SPOSTO R., WEINER M.A., LONES M.A., PERKINS S.L. & MASSEY V. (2002) Feasibility of upfront dose-intensive chemotherapy in children with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: preliminary results from the Children's Cancer Group Study CCG-59704. *Annals of Oncology* 13, 107-111

MACDONALD V.S., THAMM D.H., KURZMAN I.D., TUREK M.M. & VAIL D.M. (2005) Does L-asparaginase influence efficacy or toxicity when added to a standard CHOP protocol for dogs with lymphoma? *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19, 732-736

MAULDIN G.E., FOX P.R., PATNAIK A.K., BOND B.R., MOONEY S.C. & MATUS R.E. (1992) Doxorubicin-induced cardiotoxicosis. Clinical features in 32 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 6, 82-88

MOORE A.S., COTTER S.M., RAND W.M., WOOD C.A., WILLIAMS L.E., LONDON C.A., FRIMBERGER A.E. & L'HEUREUX D.A. (2001) Evaluation of a discontinuous treatment protocol (VELCAP-S) for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15, 348-354

MYERS N.C. 3RD, MOORE A.S., RAND W.M., GLIATTO J. & COTTER S.M. (1997) Evaluation of a multidrug chemotherapy protocol (ACOPA II) in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 11, 333-339

NORTHRUP N.C., RASSNICK K.M., SNYDER L.A., STONE M.S., KRISTAL O., COTTER S.M. & MOORE A.S. (2002) Neutropenia associated with vincristine and L-asparaginase induction chemotherapy for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16, 570-575

OGILVIE G.K., VAIL D.M., KLEIN M.K., POWERS B.E. & DICKINSON K. (1991) Weekly administration of low-dose doxorubicin for treatment of malignant lymphoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198, 1762-1764

OWEN LN. (1980). TNM classification of tumors of domestic animals. 1st edn, Geneva, Switzerland: World Health Organization, 46-47

PFREUNDSCHUH M., HASENCLEVER D., LOEFFLER M., EHNINGER G., SCHMITZ N., KIRCHNER H., KOCH P., LATHAN B., RUEFFER U., SEXTRO M., FRANKLIN J., TESCH H. & DIEHL V. (2001) Dose escalation of cytotoxic drugs using haematopoietic growth factors: a randomized trial to determine the magnitude of increase provided by GM-CSF. *Annals of Oncology* 12, 471-477

PIEK C.J., RUTTEMAN G.R. & TESKE E. (1999) Evaluation of the results of a L-asparaginase-based continuous chemotherapy protocol versus a short doxorubicin-based induction chemotherapy protocol in dogs with malignant lymphoma. *The Veterinary Quarterly* 21, 44-49

RIBRAG V., NASR F., BOUHRIS J.H., BOSQ J., BRAULT P., GIRINSKY T., COSSET J.M., MUNCK J.N., CORTI C., DECAUDIN D., PICO J.L., HAYAT M. & CARDE P. (1998) VIP (etoposide, ifosfamide and cisplatinum) as a salvage intensification program in relapsed or refractory Hodgkin's disease. *Bone Marrow Transplantation* 21, 969-974

SIMON D., NOLTE I., EBERLE N., ABBREDERIS N., KILLICH M. & HIRSCHBERGER J. (2006) Treatment of dogs with lymphoma using a 12-week, maintenance-free combination chemotherapy protocol. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 948-954

VETERINARY CO-OPERATIVE ONCOLOGY GROUP (VCOG) (2004) Veterinary Co-operative Oncology Group - Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) following

chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Veterinary and Comparative Oncology* 2, 195-213

VICKERY K.R., WILSON H., VAIL D.M. & THAMM D.H. (2008) Dose-escalating vinblastine for the treatment of canine mast cell tumour. *Veterinary and Comparative Oncology* 6, 111-119

ZEMANN B.I., MOORE A.S., RAND W.M., MASON G., RUSLANDER D.M., FRIMBERGER A.E., WOOD C.A., L'HEUREUX D.A., GLIATTO J. & COTTER S.M. (1998) A combination chemotherapy protocol (VELCAP-L) for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12, 465-470

IV. DISKUSSION

4.1 Dosissteigerung und Dosisintensität

Bei der Therapie des kaninen malignen Lymphoms können mit Doxorubicin-haltigen Kombinations-Chemotherapie-Protokollen Remissionsraten zwischen 76 % und 92 % und mediane Überlebenszeiten von einem Jahr erreicht werden (MOORE *et al.*, 2001, GARRETT *et al.*, 2002, SIMON *et al.*, 2006). Soweit bekannt, wurde bisher kein Dosis-intensivierendes simultanes Chemotherapie-Protokoll als alleinige Therapie beim malignen Lymphom des Hundes eingesetzt. Das Ziel der Studie war die Evaluierung von Toxizität, Remissionsrate, Remissionsdauer und die individuelle Dosisvariation der einzelnen Patienten bei diesem einzigartigen Therapieansatz. Die Hypothese dieser Studie war, dass durch die simultane Applikation dreier verschiedener Chemotherapeutika (Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin) aus unterschiedlichen Wirkstoffgruppen mit individueller Dosissteigerung weniger Nebenwirkungen bei gleichbleibend hoher Remissionsrate und gleichbleibenden oder längeren Remissionszeiten erreicht werden.

Als Anfangsdosis wurden 33 % der jeweiligen Standarddosis gewählt, da dies bei der simultanen Gabe aller drei Medikamenten einer effektiven Dosis von 100 % entspricht. Bei dieser Anfangsdosis ist die kumulative Dosisintensität somit gleich der Dosisintensität bei einem konventionellen Kombinations-Chemotherapie-Protokoll. Zum Vergleich würden bei einem konventionellen Protokoll 100-%-Dosis Vincristin, Cyclophosphamid oder Doxorubicin im wöchentlichen Abstand appliziert werden (GARRETT *et al.*, 2002, SIMON *et al.*, 2006). Bei der anfänglichen Applikation von jeweils 33 % entspricht dies somit einer 100-%-Dosisintensität, welche im Verlauf des Protokolls im optimalen Verlauf auf bis zu 180 % gesteigert wird. Eine weitere Überlegung war, dass bei einer Anfangsdosis 67 % unter der maximal tolerierten Dosis der einzelnen Zytostatika, Nebenwirkungen aufgrund überlappender Toxizität, wie z. B. eine Myelosuppression, von geringerer Bedeutung sein würden. Die maximale Dosis von 60 % ist durch die spezielle Dosissteigerung dieses Protokolls bedingt. Das Dosis-intensivierende simultane Chemotherapie-Protokoll (DISC-Protokoll) ist als 13-wöchiges Protokoll ohne Erhaltungsphase angelegt. Alle Dosisstufen wurden vor einer Steigerung zweimalig appliziert. Aufgrund dieser doppelten Applikation jeder Stufe vor einer Dosissteigerung von 5 % über zwölf Wochen lag die maximal erreichbare Dosisstufe bei 60 %.

Die wöchentliche Applikation von Doxorubicin bei Hunden mit malignem Lymphom in einer reduzierten Dosis (10 mg/m², statt alle 3 Wochen 30 mg/m²) zeigte zwar deutlich weniger Nebenwirkungen, v. a. weniger Zytopenien, allerdings erreichten kaum Hunde eine komplette oder partielle Remission (OGILVIE *et al.*, 1991). In dieser Studie blieb zwar die Summationsdosis gleich, jedoch war die Dosisintensität zum Zeitpunkt der Applikation deutlich verringert. Mit dem DISC-Protokoll wurde bereits mit der Anfangsdosis eine Dosisintensität von 100 % erreicht. Bei Tieren, die eine Dosissteigerung tolerierten, konnten Dosisintensitäten von bis zu 180 % erreicht werden. Aufgrund der kleinen Fallzahlen in den einzelnen Dosisstufen konnte jedoch der Einfluss von erreichter Dosisstufe auf die Remissionsdauer nicht evaluiert werden. In einer Studie von 2007 hatte eine Therapieverzögerung oder Dosisreduktion auf die Remissionsrate und -dauer keinen signifikanten Einfluss. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass Hunde mit Grad III und IV Neutropenien signifikant längere Remissionszeiten aufwiesen (VAUGHAN *et al.*, 2007). Auch dieser Einfluss konnte aufgrund der kleinen Fallzahl in der aktuellen Studie nicht weiter untersucht werden. Auch in einer weiteren Studie konnte kein Zusammenhang zwischen Dosisintensität und Überlebenszeit gezeigt werden. In dieser Studie von Sorenmo und Kollegen wurde Doxorubicin als Dosis-intensivierendes Mono-Chemotherapie-Protokoll im zwei-wöchigen statt drei-wöchigen Abstand zur adjuvanten Therapie des kaninen Hämangiosarkoms appliziert (SORENMO *et al.*, 2004).

4.2 Staging

In dieser Studie (DISC-Protokoll) wurde nicht bei allen Hunden ein komplettes Staging vorgenommen. Auch wurde nur bei einigen Hunden eine Knochenmarkuntersuchung durchgeführt. Jedoch hatte in früheren und aktuellen Studien das klinische Stadium keinen Einfluss auf die Remissionsrate oder Überlebenszeit der Patienten (DOBSON *et al.*, 2001, LANA *et al.*, 2006, FLORY *et al.*, 2007). Der Einfluss des klinischen Stadiums auf den Therapieerfolg und Toxizität des DISC-Protokolls wurde daher auch aufgrund der kleinen Patientenzahl und da sich die meisten Hunde Stadium III oder IV, nur wenige in Stadium V und keine in Stadium I oder II befanden, nicht weiter evaluiert.

4.3 Toxizität

In dieser Studie wurde nur ein Fall von Sepsis beobachtet. Der betroffene Hund war diabetisch und litt an einer Harnwegsinfektion mit *Escherichia coli*. Dieser Hund wurde vor der Teilnahme an der Studie neun Wochen mit hoch-dosierten Kortikosteroiden (2 mg/kg Prednisolon alle 12 Stunden p. os) therapiert und entwickelte einen iatrogenen Diabetes mellitus. Der Patient erholte sich vollständig und konnte nach drei Tagen stationärem Aufenthalt entlassen werden. Hunde mit Diabetes mellitus oder Hyperadrenokortizismus sind für Sekundärinfektionen prädisponiert. Sie leiden vor allem an Harnwegsinfektionen mit *E. coli* (HESS *et al.*, 2000). In diesem Fall wird diese Prädisposition bei diabetischen Hunden und nicht ein erhöhtes toxisches Potential des DISC-Protokolls als Ursache für die Sepsis bei diesem Patienten vermutet. Zwei weitere Hunde mit erhöhter rektaler Körpertemperatur, ohne jegliche weitere Anzeichen einer Sekundärinfektion oder Sepsis, wurden als ambulante Patienten oral mit Antibiotika behandelt. Bei beiden Hunden wurde zu Hause von den Besitzern die rektale Körpertemperatur überprüft und befand sich bei beiden bereits am selben Abend wieder im Referenzbereich. Bei diesen beiden Patienten ist nicht ganz klar, ob wirklich eine beginnende Sepsis vorlag, die durch die schnelle Antibiotikagabe rechtzeitig eingedämmt werden konnte oder ob nur eine Hyperthermie bestand. Beide Hunde wurden während der Sommermonate therapiert und wurden mit dem Auto zu den jeweiligen Therapiezyklen gebracht. Eine Hyperthermie könnte also durch eine Autofahrt in der Hitze oder auch durch Aufregung die Ursache für die erhöhte Temperatur der beiden Hunde gewesen sein. Eine solche Temperaturerhöhung kann durch Aufregung oder Anstrengung (exertionell) oder durch eine Erhöhung der Umgebungstemperatur (Umwelt-bedingt) verursacht werden (BRUCHIM *et al.*, 2006). Da bei beiden Patienten keine weiteren Anzeichen für eine Sepsis, wie z. B. eine Neutrophilie mit Linksverschiebung, ein Infektionsherd oder eine erhöhte Atem- und Herzfrequenz gefunden werden konnten, ist in diesen Fällen eine Hyperthermie wahrscheinlicher als echtes Fieber. Außer der Sepsis trat während des gesamten Protokolls nur eine weitere Grad-IV-Toxizität auf. Dies war eine asymptomatische Neutropenie, die nach prophylaktischer Antibiotikagabe ohne klinische Symptome blieb. Bei Neutrophilenzahlen unter 1000/ μ l wird eine prophylaktische Antibiotikagabe und Temperaturkontrolle empfohlen, sollte das Tier klinisch unauffällig sein und keine Anzeichen einer bakteriellen Infektion aufweisen (CHUN *et al.*, 2007).

L-Asparaginase wurde am ersten Therapietag immer in der üblichen 100%-Dosis verabreicht. Nach Gabe von L-Asparaginase traten mehrere hämatologische Toxizitäten auf; und zwar Neutropenien, Thrombozytopenien und Anämien. Diese konnten außer bei den Hunden, die bereits vor Therapiebeginn die entsprechende Zytopenie aufwiesen, nicht sofort erklärt werden. Bei diesen Patienten lag vermutlich eine paraneoplastische Zytopenie vor. Bei Lymphompatienten zeigt sich im Routinelabor vor Therapiebeginn relativ häufig eine paraneoplastische Thrombozytopenie oder Anämie (KELLER *et al.*, 1993, GARRETT *et al.*, 2002, ABBO und LUCROY, 2007). Auch treten bei Hunden, die mit L-Asparaginase und Vincristin gleichzeitig therapiert werden, gehäuft Neutropenien

auf (NORTHRUP *et al.*, 2002). L-Asparaginase alleine gilt üblicherweise jedoch nicht als myelosuppressiv, es werden vielmehr allergische Reaktionen beschrieben, da es als bakterielles Enzym ein Fremdprotein darstellt (MASETTI und PESSION, 2009). Solche anaphylaktischen Reaktionen wurden bei Durchführung dieser Studie jedoch nicht beobachtet. Die in dieser Studie aufgetretenen Zytopenien nach Gabe von L-Asparaginase sind vermutlich durch eine individuell unterschiedlich starke myelosuppressive Wirkung dieses Medikaments zu erklären.

Obwohl alle Patienten während des Studienprotokolls wöchentlich mit Cyclophosphamid therapiert wurden, zeigte kein einziger Hund Symptome einer hämorrhagischen Zystitis. Alle therapierten Hunde erhielten prophylaktisch 0,5 mg/kg Furosemid zweimal täglich für zwei Tage begleitend zu jedem Therapiezyklus. Bei intravenöser Therapie mit Cyclophosphamid ohne prophylaktische Furosemid-Gabe tritt bei ca. 9 % der Hunde eine sterile hämorrhagische Zystitis auf. Wird gleichzeitig Furosemid verabreicht, zeigen nur 1,2 % der therapierten Hunde Symptome (CHARNEY *et al.*, 2003). Die prophylaktische Furosemid-Gabe könnte somit erklären, dass keiner der therapierten Hunde eine sterile hämorrhagische Zystitis entwickelte.

Auch wurde keine Kardiotoxizität nach Gabe von Doxorubicin beobachtet. Es wurden jedoch nur wenige Hunde bis Dosisstufe 50 % oder höher therapiert. Auch wurde bei keinem der Patienten eine Echokardiographie oder Serum-Troponin-I-Messungen durchgeführt. Troponin I ist ein sensitiver und spezifischer Marker für einen akuten Myokardschaden (BURGENER *et al.*, 2006). Die Serum-Troponin-I-Konzentration kann bei Hunden unter Doxorubicin-Therapie ab einer kumulativen Dosis von 180 mg/m² erhöht sein, was für einen akuten Myokardschaden spricht. In den untersuchten Fällen war dieser jedoch nur subklinisch (DEFRANCESCO *et al.*, 2002). Troponin-I-Konzentrationen könnten aber somit zur Früherkennung von Doxorubicin-induzierten Myokardschäden eingesetzt werden. Kardiale Nebenwirkungen von Doxorubicin können in dieser Studie nicht vollständig ausgeschlossen werden, sind jedoch unwahrscheinlich, da die maximale kumulative Doxorubicin-Dosis im Verlauf der Studie nur bei 170 mg/m² lag. Bei einer initial höheren Dosisstufe oder einer Steigerung auf über 60 % würde die kumulative Doxorubicin-Dosis bei einzelnen Hunden bei über 180 mg/m² liegen, was mit einem erhöhten Risiko für eine Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie einhergehen würde. Ab kumulativen Dosen von 180 mg/m² oder mehr ist ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie beschrieben (MAULDIN *et al.*, 1992). Es wurde auch in einer anderen Studie Doxorubicin wöchentlich in reduzierter Dosis (10 mg/m² wöchentlich statt 30 mg/m² alle 3 Wochen) verabreicht, ohne dass kardiale Nebenwirkungen aufgetreten sind (OGILVIE *et al.*, 1991). Auch bei einem Dosis-intensivierenden Doxorubicin-Protokoll zur adjuvanten Behandlungen des kaninen Hämangiosarkoms wurde keine Kardiotoxizität beschrieben (SORENMO *et al.*, 2004).

Es verstarb kein Patient, d. h. es wurde kein Patient aufgrund der Therapie oder Toxizität euthanasiert. Insgesamt gesehen waren die Nebenwirkungen und Toxizität des DISC-Protokolls sehr akzeptabel und im Vergleich zu konventionellen Doxorubicin-haltigen Chemotherapie-Protokollen sogar reduziert (MYERS *et al.*, 1997, ZEMANN *et al.*, 1998, CHUN *et al.*, 2000; MOORE *et al.*, 2001; GARRETT *et al.*, 2002, MACDONALD *et al.*, 2005, SIMON *et al.*, 2006). In der Studie von Moore und Kollegen mussten bei 31 von 82 Hunden aufgrund von Nebenwirkungen die Dosierungen reduziert werden. Auch hier wurde ein Multi-Chemotherapie-Protokoll ohne Erhaltungsphase evaluiert (VELCAP-S). Während des Protokolls starben sogar drei myelosupprimierte Patienten an Sepsis und fünf weitere litten an einer sterilen hämorrhagischen Zystitis, auch mussten sieben Patienten mit gastrointestinalen Nebenwirkungen hospitalisiert werden (MOORE *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu gab es bei der Durchführung des DISC-Protokolls keinen Therapie- oder Toxizität-induzierten Todesfall, auch entwickelte keiner der Hunde eine sterile hämorrhagische Zystitis. Auch musste nur ein Hund aufgrund von Sepsis (Grad IV) hospitalisiert werden. Dieser konnte jedoch nach drei Tagen bei gutem

Allgemeinbefinden entlassen werden. Andere Nebenwirkungen waren in der Regel mild (Grad I und II; gastrointestinale Symptome) oder verliefen asymptomatisch (hämatologische Nebenwirkungen). Bei den hämatologischen Nebenwirkungen gab es zwei Grad III und eine Grad IV Neutropenie, alle verliefen jedoch asymptomatisch und die Hunde erholten sich davon schnell und vollständig. Auch zwei Grad III Thrombozytopenien bei demselben Patienten verliefen klinisch unauffällig; der betroffene Hund zeigte klinisch keinerlei Anzeichen einer Blutungsneigung. Dahingegen lag bei einem der vorher erwähnten Protokolle die Mortalitätsrate während der Induktionsphase bei 22 % bei einem weiteren Protokoll sogar bei 27 % (MYERS *et al.*, 1997, CHUN *et al.*, 2000).

4.4. Remissionsrate und –dauer

In dieser Studie lag die Remissionsrate bei 85,7 % mit einer kompletten Remissionsrate von 80,9 %. Diese komplette Remissionsrate ist vergleichbar mit oder unwesentlich niedriger als bei anderen konventionellen Doxorubicin-haltigen Kombinations-Chemotherapie-Protokollen. Moore und Kollegen erreichten eine komplette Remissionsrate von 68 %, Simon und Kollegen eine von 76,3 % (MOORE *et al.*, 2001, SIMON *et al.*, 2006). Zwei weitere Studien berichteten von Remissionsraten von 67,7 %, 71,2 % und 92,3 % (PIEK *et al.*, 1999, GARRETT *et al.*, 2002). In einer der Studien wurden zwei Protokolle miteinander verglichen, deshalb gibt es hier zwei Angaben zu Remissionsraten (PIEK *et al.*, 1999). Die geringgradig niedrigere Remissionsrate im Vergleich zu einigen anderen Studien könnte durch die Tatsache erklärbar sein, dass einige Hunde aus dem Protokoll genommen wurden, bevor sie mit mehreren Dosen behandelt werden konnten. Ein weiterer Grund könnte die Entwicklung einer multiplen Medikamentenresistenz (MDR = multiple drug resistance) sein, die sowohl durch die Vorbehandlung mit Prednisolon bei einigen Hunden als auch durch den niedrig-dosierten simultanen Therapieansatz des DISC-Protokolls bedingt sein könnte. Die Entwicklung einer MDR aufgrund einer Vorbehandlung ist vor allem beim malignen Lymphom beschrieben (MOORE *et al.*, 1995, LEE *et al.*, 1996). Jedoch existieren auch Chemotherapie-Protokolle, bei denen Medikamente täglich niedrig dosiert verabreicht werden. In einem Protokoll werden beispielsweise Prednisolon (20 mg), Cyclophosphamid (25 mg), Procarbazin (50 mg) und Etoposid (50 mg) täglich oral verabreicht und dennoch wurde kein erhöhtes Auftreten von Medikamentenresistenzen beschrieben (COLEMAN *et al.*, 2008a, COLEMAN *et al.*, 2008b).

Die mediane komplette Remissionszeit in dieser Studie betrug 294 Tage (68 bis > 730 Tage). Diese schneidet im Vergleich zu konventionellen Doxorubicin-haltigen Kombinations-Chemotherapie-Protokollen sehr gut ab. Hier liegen die medianen Remissionszeiten bei 140 bis 385 Tagen (ZEMANN *et al.*, 1998, PIEK *et al.*, 1999; CHUN *et al.*, 2000, MOORE *et al.*, 2001, GARRETT *et al.*, 2002, MACDONALD *et al.*, 2005, SIMON *et al.*, 2006).

4.5 Individuelle Dosissteigerung

Die individuelle Toleranz der unterschiedlichen Dosisstufen war sehr erstaunlich. Manche Hunde konnten aufgrund von Nebenwirkungen nicht weiter Dosis-eskaliert, sondern nur mit der Eingangsdosisstufe von 33 % behandelt werden. Aufgrund dieser Tatsache wird nicht empfohlen, die initiale Dosisstufe zu erhöhen. Die maximale Dosisstufe von 60 % erreichten zwei Hunde ohne Probleme, sechs Hunde konnten bis 55 % und acht bis zu 50 % gesteigert werden. Diese sehr große interindividuelle Dosisvariation wurde auch bei Hunden beobachtet, die mit Vinblastin gegen Mastzelltumoren behandelt wurden. Die Dosierung von Vinblastin in dieser Studie reichte von 2 mg/m² bis 3 mg/m². Die empfohlene Dosierung für Vinblastin sind 2 mg/m² (VICKERY *et al.*, 2008). Diese Variabilität konnte auch in einer weiteren Studie gezeigt werden. Hier wurden Hunde mit Mitoxantron in verschiedenen Dosierungen therapiert. Die empfohlene Standarddosierung liegt bei 5 mg/m²; in dieser Studie wurden die Hunde jedoch mit bis zu 6,5 mg/m² therapiert. Obwohl es auch

hier zu Toxizitäten kam, so tolerierten doch einige Individuen diese im Vergleich deutlich erhöhte Dosis ohne Probleme (OGILVIE *et al.*, 1994). Dies unterstützt die Hypothese, dass Hunde, und vor allem die Reservekapazität des Knochenmarks, eine sehr große inter-individuelle Dosis toleranz besitzen.

4.6 Schlussbetrachtung

Das DISC-Protokoll wird von Hunden mit malignem Lymphom gut toleriert und es werden im Vergleich zu konventionellen Doxorubicin-haltigen Chemotherapie-Protokollen ähnliche und zum Teil sogar bessere Remissionraten und -zeiten erreicht. Die Studienziele konnten somit voll und ganz erfüllt werden.

Trotz der prospektiven Natur der Studie gibt es einige kleinere Schwachstellen. Da die Durchführung dieser Studie eine Pilotstudie darstellt, wurden nur wenige Hunde mit dem DISC-Protokoll therapiert. Aufgrund dieser geringen Fallzahl konnte keine weiterführende statistische Auswertung bezüglich Prognose und Dosisstufe oder klinisches Stadium ausgeführt werden. Darüber hinaus sind weitere Studien vonnöten, um die Vorteile der individuellen Dosisanpassung und gesteigerten Dosisintensität zu evaluieren. Dies ist auf jeden Fall anzuraten, da die Toxizität des Protokolls aufgrund der individuellen Dosisanpassung nur sehr gering ist und die Remissionraten und -zeiten bereits jetzt mit konventionellen Kombinations-Chemotherapie-Protokollen vergleichbar sind. In zukünftigen Protokollen könnte die Dosissteigerung nach einmaliger Gabe jeder Dosisstufe erfolgen, um die Dosis schneller zu intensivieren und mehr Hunde auf höheren Dosisstufen zu therapieren. Auch könnte die maximale Dosisstufe auf 65 % Prozent erhöht werden, ohne die kumulative Dosis von Doxorubicin zu weit zu steigern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Das maligne Lymphom ist die häufigste hämatopoetische Neoplasie des Hundes. Die chemotherapeutische Behandlung mit Doxorubicin-haltigen Protokollen wird als die Therapie der Wahl angesehen. Dem Autor ist kein Dosis-intensivierendes simultanes Chemotherapie-Protokoll zur Behandlung des kaninen Lymphoms bekannt. Die Hypothese dieser Studie war, dass die Behandlung mit einem 13-wöchigen Dosis-intensivierenden simultanen Chemotherapie (DISC)-Protokoll zu weniger Nebenwirkungen und vergleichbaren oder sogar besseren Remissionsraten und medianen Remissionszeiten führt. Auftretende Nebenwirkungen sowie Remissionsraten und -zeiten wurden protokolliert. Es wurden prospektiv 21 Hunde mit dem Studienprotokoll behandelt. Die Diagnose ‚malignes Lymphom‘ wurde durch eine zytologische oder histologische Untersuchung gestellt. Das DISC-Protokoll ist ein 13-wöchiges Chemotherapie-Protokoll ohne Erhaltungsphase. An Tag 1 wurde L-Asparaginase (400 IU/kg SC) verabreicht. Danach folgte die wöchentliche simultane Gabe von Vincristin (0,7 mg/m² IV = 100 %), Cyclophosphamid (200 mg/m² IV = 100 %) und Doxorubicin (30 mg/m² IV = 100 %) mit einer initialen Dosisstufe von 33 %. Die jeweiligen Dosisstufen wurden zweimalig verabreicht und dann um 5-7 % bis zu einer maximalen Dosisstufe von 60 % erhöht, wenn keine oder nur Grad-I-Toxizitäten auftraten. Zusätzlich erhielten die Hunde therapiebegleitend für drei aufeinanderfolgende Tage 2 mg/kg Prednisolon und 0,5 mg/kg Furosemid PO. Bei zwei Hunden zeigten sich Grad-IV-Toxizitäten auf (eine asymptomatische Neutropenie bzw. eine Sepsis). Des Weiteren wurden zwei Grad-III-Thrombozytopenien und eine Grad-III-Neutropenie beschrieben. Weitere Nebenwirkungen waren selten und nur geringgradig. Der septische Patient wurde für 48 Stunden hospitalisiert und konnte nach dieser Zeit bei gutem Allgemeinbefinden entlassen werden. Im Verlauf der Studie verstarb keines der Tiere aufgrund von Nebenwirkungen oder wurde deshalb euthanasiert. Es trat auch bei keinem der Hunde eine sterile hämorrhagische Zystitis auf, obwohl alle wöchentlich mit Cyclophosphamid therapiert wurden. Siebzehn Hunde erreichten eine komplette Remission (80,9 %), ein weiterer eine partielle Remission (4,8 %), zwei erfuhren eine stabile Erkrankung (9,5 %) und ein Hund zeigte ein Fortschreiten der Erkrankung (4,8 %). Die mediane Remissionszeit für Hunde in kompletter Remission betrug 294 Tage. Im Vergleich zu anderen konventionellen Kombinations-Protokollen sind das Nebenwirkungsspektrum sowie Remissionsraten und -zeiten vergleichbar bis sogar verbessert. Die inter-individuelle Dositoleranz innerhalb des Protokolls war sehr weit gefächert. Zwei Hunde konnten optimal bis zur Dosisstufe von 60 % eskaliert werden, weitere fünf konnten auf Dosisstufe 55 % therapiert werden, jedoch konnte bei drei Hunden die Dosis nicht über 33 % hinaus gesteigert werden. Das DISC-Protokoll wurde im Allgemeinen sehr gut toleriert und Remissionsraten sowie -zeiten waren mit konventionellen Kombinations-Protokollen vergleichbar oder sogar verbessert. Zusammenfassend ist zu sagen, dass alle Ziele der Studie erfüllt wurden. Des Weiteren wird momentan das Nachfolger-DISC-Protokoll durchgeführt, bei dem wöchentlich eine Dosissteigerung vorgenommen wird, um einen potentiellen Vorteil dieser individuellen Dosissteigerung bei der Therapie des kaninen Lymphoms zu evaluieren.

VI. SUMMARY

Malignant lymphoma is the most common hematopoietic neoplasia in the dog. Chemotherapy with doxorubicin-containing combination protocols is considered standard of care. To the author's knowledge no simultaneous dose intensifying chemotherapy protocol has been evaluated in the treatment of canine lymphoma. The hypothesis of this study was that treatment with a 13-week Dose Intensifying Simultaneous Chemotherapy (DISC) protocol will result in less toxicity and comparable or even better remission rates and median remission duration than conventional combination protocols. The toxicity profile of the DISC protocol for dogs with lymphoma was recorded. In addition, remission rates and duration were evaluated. Twenty-one dogs were prospectively enrolled in the study. Diagnosis of malignant lymphoma was based either on cytology or histology. The DISC protocol was designed as a 13-week maintenance free protocol. L-Asparaginase (400 IU/kg SC) was administered on day 1, followed by weekly simultaneous administration of vincristine (0.7 mg/m² IV = 100%), cyclophosphamide (200 mg/m² IV = 100%), and doxorubicin (30 mg/m² IV = 100%) at a starting dose level of 33%. Dose levels were given twice and then increased by 5-7% if \leq grade I toxicities were seen to a maximum dose level of 60%. In addition, dogs received 2 mg/kg prednisolone PO for 3 consecutive days and 0.5 mg/kg furosemide PO for 2 consecutive days at each treatment cycle. Two dogs experienced a grade IV toxicity each (asymptomatic neutropenia and sepsis, respectively). Two asymptomatic grade III thrombocytopenic and 1 neutropenic episodes were recorded. Other toxic events were infrequent and only mild. The septic dog required hospitalization for less than 48 hours and was discharged in good general condition. No dog was euthanized or died during the protocol because of treatment related side effects. Also no episode of sterile hemorrhagic cystitis was recorded, even though all dogs received weekly doses of cyclophosphamide. Response distribution was as follows: Complete remission 17/21 (80.9%); partial remission 1/21 (4.8%); stable disease 2/21 (9.5%); and progressive disease 1/21 (4.8%). Median complete remission duration was 294 days. Toxicity profile, remission rates, and duration compare favourably to most other multidrug chemotherapy protocols. Inter-individual dose variation was marked; 2 dogs reached the final dose level of 60%, 4 were treated up to dose level 55%, but in 3 dogs dose level could not be escalated beyond 33%. The DISC protocol was very well tolerated and remission rates and duration were equal or even better than with conventional combination protocols. In conclusion, the objectives of this study were altogether achieved. Further studies evaluating a DISC protocol with dose escalations every treatment cycle are ongoing to clearly elucidate a possible advantage of individual dose intensifying strategies on treatment outcome in dogs with lymphoma.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- ABBO AH, LUCROY MD. Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006). *J Am Vet Med Assoc* 2007;231:1836-42.
- ARCAMONE F, CASSINELLI G, FANTINI G, et al. Adriamycin, 14-hydroxy-daunmycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 1969;11:1101-10.
- BAILEY D, ERB H, WILLIAMS L, et al. Carboplatin and doxorubicin combination chemotherapy for the treatment of appendicular osteosarcoma in the dog. *J Vet Intern Med*, 2003;17:199-205.
- BALLEGEER EA, FORREST LJ, DICKINSON RM, et al. Correlation of ultrasonographic appearance of lesions and cytologic and histologic diagnoses in splenic aspirates from dogs and cats: 32 cases (2002-2005). *J Am Vet Med Assoc* 2007;230:690-6.
- BARISTA I, TEKUZMAN G, YALCIN S, et al. Treatment of advanced soft tissue sarcomas with ifosfamide and doxorubicin combination chemotherapy. *J Surg Oncol* 2000;73:12-6.
- BASKIN CR, COUTO CG, WITTUM TE. Factors influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study. *J Am Anim Hosp Assoc* 2000;36:404-9.
- BENJAMIN RS. A practical approach to adriamycin (NSC-123127) toxicology. *Cancer Chemother Rep* 1975;6:191-4.
- BERG J, WEINSTEIN MJ, SPRINGFIELD DS, et al. Results of surgery and doxorubicin chemotherapy in dogs with osteosarcoma. *J Am Vet Med Assoc* 1995;206:1555-60.
- BERGMAN PJ, OGILVIE GK, POWERS BE. Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 1996;10:354-9.
- BLACKWOOD L, SULLIVAN M, LAWSON H. Radiographic abnormalities in canine multicentric lymphoma: a review of 84 cases. *J Small Anim Pract.* 1997;38:62-9.
- BOYCE KL, KITCHELL BE. Treatment of canine lymphoma with COPLA/LVP. *J Am Anim Hosp Assoc* 2000;36(5):395-403.
- BRUCHIM Y, KLEMENT E, SARAGUSTY J, et al. Heat stroke in dogs: A retrospective study of 54 cases (1999-2004) and analysis of risk factors for death. *J Vet Intern Med* 2006;20:38-46.
- BURGENER IA, KOVACEVIC A, MAULDIN GN, et al. Cardiac troponins as indicators of acute myocardial damage in dogs. *J Vet Intern Med* 2006;20:277-83.
- CAMPBELL KL. *Small Animal Dermatology Secrets*, Urbana, IL, Hanley and Belfus, 2004;431-41.
- CARLO GL, COLE P, MILLER AB, et al. Review of a study reporting an association between 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and canine malignant lymphosarcoma: Report of an expert panel. *Regul Toxicol Pharmacol* 1992;16:245-52.
- CARTER RF, HARRIS CK, WITHROW SJ, et al. Chemotherapy of canine lymphoma with histopathological correlation: doxorubicin alone compared to COP as first treatment regimen, *J Am Anim Hosp Assoc* 1987;23:587-96.

CHARNEY SC, BERGMAN PJ, HOHENHAUS AE, et al. Risk factors for sterile hemorrhagic cystitis in dogs with lymphoma receiving cyclophosphamide with or without concurrent administration of furosemide: 216 cases (1990-1996). *J Am Vet Med Assoc* 2003; 222:1388-93.

CHEW DJ, MEUTEN DJ. Vet Disorders of calcium and phosphorus metabolism. *Clin North Am Small Anim Pract.* 1982;12:411-38.

CHRISTOPHER MM. Cytology of the spleen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003;33:135-52.

CHUN R, GARRETT LD, VAIL DM. Evaluation of a high-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 2000;14:120-4.

CHUN R, GARRETT LD, VAIL DM. Cancer Chemotherapy. In: Withrow SJ, MacEwen EG *Small Animal Clinical Oncology*, 4th edn., Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company 2007;163-92.

CHUN R. Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? *Top Companion Anim Med*, 2009;24:157-62.

COLEMAN M, MARTIN P, RUAN J, et al. Low-dose metronomic, multidrug therapy with the PEP-C oral combination chemotherapy regimen for mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2008a;49:447-50.

COLEMAN M, MARTIN P, RUAN J, et al. Prednisone, etoposide, procarbazine, and cyclophosphamide (PEP-C) oral combination chemotherapy regimen for recurring/refractory lymphoma: low-dose metronomic, multidrug therapy. *Cancer* 2008b;112:2228-32.

COTTER SM, GOLDSTEIN MA. Treatment of lymphoma and leukemia with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone. I. Treatment of the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983;19:159-65.

COUTO CG, CULLEN J, PEDROIA V, et al. Central nervous system lymphosarcoma in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1984;184:809-13.

COUTO GC. Canine lymphomas: Something old, something new. *Comp Cont Edu* 1985;7:291-302.

COWELL RL, DORSEY KE, MEINKOTH JH. Lymph node cytology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003;33:47-67.

CROW SE, THEILEN GH, MADEWELL BR, et al. Cyclophosphamide-induced cystitis in the dog and cat. *J Am Vet Med Assoc* 1977;171:259-62.

CVETKOVIC RS, SCOTT LJ. Dexrazoxane: a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs* 2005;65:1005-24.

CZOCK D, KELLER F, RASCHE FM, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:61-98.

DAY MJ. Review of thymic pathology in 30 cats and 36 dogs. *J Small Anim Pract* 1997;38:393-403.

DEFRANCESCO TC, ATKINS CE, KEENE BW, et al. Prospective clinical evaluation of serum cardiac troponin T in dogs admitted to a veterinary teaching hospital. *J Vet Intern Med* 2002;16:553-7.

DICKINSON RM. Canine lymphosarcoma: overcoming diagnostic obstacles and introduction to the latest diagnostic techniques. *Can Vet J* 2008;49:305-8.

DOBSON JM, BLACKWOOD LB, MCINNES EF, et al. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J Small Anim Pract* 2001;42:377-84.

DOBSON JM, SAMUEL S, MILSTEIN H, et al. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Animal Pract* 2002; 43, 240-6.

DORN CR, TAYLOR DO, HIBBARD HH. Epizootiologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *Am J Vet Res* 1967;28:993-1001.

DORN CR, TAYLOR DO, SCHNEIDER R, et al. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst* 1968;40:307-18.

DORN CR, TAYLOR DO, SCHNEIDER R. The epidemiology of canine leukemia and lymphoma. *Bibl Haematol* 1970;36:403-15.

DOROSHOW JH. Anthracyclines and Anthracenediones. In: Chabner BA, Longo DL. *Cancer Chemotherapy & Biotherapy. Principles and Practice*, 4th edn., Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins 2006;414-51.

DUNCAN JR, PRASSE KW. Cytology of canine cutaneous round cell tumors. Mast cell tumor, histiocytoma, lymphosarcoma and transmissible venereal tumor. *Vet Pathol* 1979;16:673-9.

ELMSLIE RE, GLAWE P, DOW SW. Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. *J Vet Intern Med* 2008;22:1373-9.

ETTINGER SN. Principles of treatment for canine lymphoma. *Clin Tech Small Anim Pract* 2003;18:92-7.

FAN TM. Lymphoma updates. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003;455-71.

FISHER RI, MILLER TP, DANA BW, et al. Southwest oncology group clinical trials for intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Hematol* 1987;24:21-5.

FISHER RI, GAYNOR ER, DAHLBERG S, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993;328:1002-6.

FLORY AB, RASSNICK KM, STOKOL T, et al. Stage migration in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 2007;21:1041-7.

FONTAINE J, BOVENS C, BETTENAY S, et al. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell-lymphoma: a review. *Vet Comp Oncol* 2009;7:1-14.

FRIMBERGER AE, MOORE AS, RASSNICK KM, et al. A combination chemotherapy protocol with dose intensification and autologous bone marrow transplant (VELCAP-HDC) for canine lymphoma. *J Vet Intern Med*, 2006;20:355-64.

GARRETT LD, THAMM DH, CHUN R, et al. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 2002;16:704-9.

GOLDEN DL, LANGSTON VC. Uses of vincristine and vinblastine in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 1988;193:1114-7.

- GREENLEE PG, FILIPPA DA, QUIMBY FW, et al. Lymphoma in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 1990;66:480-90.
- GROSS TL, IHRKE PJ, WALDER EJ, et al. *Skin Diseases of the Dog and Cat, Clinical and Histopathologic Diagnosis*, 2nd edn., Oxford, Blackwell Science, 2005;876-88.
- HAWKINS EC, MORRISON WB, DENICOLA DB, et al. Cytologic analysis of bronchoalveolar lavage fluid from 47 dogs with multicentric malignant lymphoma. *J Am Vet Med Assoc* 1993;203:1418-25.
- HAWKINS DS, PARK JR, THOMSON BG, et al. Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10:5335-41.
- HAYES HM, TARONE RE, CANTOR KP, et al. Case control study of canine malignant lymphoma: Positive association between 2,4 dichlorophenoxyacetic acid herbicides. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1226-31.
- HELFLAND S, HAMILTON T, HUNGERFORD L, et al. Comparison of three treatments for transitional cell carcinoma of the bladder in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1994;30:270-5.
- HERMAN EH, FERRANS VJ. Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity. *Semin Oncol* 1998;25:15-21.
- HESS RS, SAUNDERS HM, VAN WINKLE TJ, et al. Concurrent disorders in dogs with diabetes mellitus: 221 cases (1993-1998). *J Am Vet Med Assoc* 2000;217:1166-73.
- HIRSCHBERGER J. [Lymph node cytology] *Tierarztl Prax* 1994 Dec;22:592-5.
- HUANG HP, YANG HL, LIANG SL, et al. Iatrogenic hyperadrenocorticism in 28 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1999;35:200-7.
- JAGIELSKI D, LECHOWSKI R, HOFFMANN-JAGIELSKA M, et al. A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000). *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2002;49:419-24.
- JÄGER U, KARTH GD, KNAPP S, et al. [Therapy of high-grade non-Hodgkin's lymphoma] *Wien Klin Wochenschr* 1994;106:315-20.
- JANN MW, LAM YW, GRAY EC, et al. Drug reversible metabolism of drugs. *Metabol Drug Interact* 1994;11:1-24.
- JORDAN MA, THROWER D, WILSON L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res* 1991;51:2212-22.
- KELLER ET, MACEWEN EG, ROSENTHAL RC, et al. Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *J Vet Intern Med* 1993;7:289-95.
- KELLER RL, AVERY AC, BURNETT RC, et al. Detection of neoplastic lymphocytes in peripheral blood of dogs with lymphoma by polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement. *Vet Clin Pathol* 2004;33:145-9.

KIUPEL M, BOSTOCK D, BERGMANN V. The prognostic significance of AgNOR counts and PCNA-positive cell counts in canine malignant lymphomas. *J Comp Pathol* 1998;119:407-18.

KIUPEL M, TESKE E, BOSTOCK D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol* 1999;36:292-300.

KHANNA C, LUND EM, REDIC KA, et al. Randomized controlled trial of doxorubicin versus dactinomycin in a multiagent protocol for treatment of dogs with malignant lymphoma. *J Am Vet Med Assoc* 1998;213:985-90.

KROHNE SGD, VESTRE WA, RICHARDSON RC, et al. Ocular involvement in canine lymphosarcoma: a retrospective study of 94 cases. *Am College Vet Ophth* 1987;Proc. 68-84.

LANA SE, JACKSON TL, BURNETT RC, et al. Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 2006;20:329-34.

LANA SE, U'REN L, PLASA S, et al. Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy of splenic hemangiosarcoma in dogs. *J Vet Intern Med* 2007;21:764-9.

LEE JJ, HUGHES CS, FINE RL, et al. P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer* 1996;77:1892-8.

LEIFERT CE, MATUR RE. Canine Lymphoma: clinical considerations. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1986;1:43-50.

LEYVRAZ S, BACCHI S, CERNY T, et al. Phase I multicenter study of combined high-dose ifosfamide and doxorubicin in the treatment of advanced sarcomas. Swiss Group for Clinical Research (SAKK). *Ann Oncol* 1998;9:877-84.

MACDONALD VS, THAMM DH, KURZMAN ID, et al. Does L-asparaginase influence efficacy or toxicity when added to a standard CHOP protocol for dogs with lymphoma? *J Vet Intern Med* 2005;19:732-6.

MACEWEN EG, BROWN NO, PATNAIK AK, et al. Cyclic combination chemotherapy of canine lymphosarcoma. *J Am Vet Med Assoc*. 1981;178:1178-81.

MADEWELL BR. Canine lymphoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1985;15:709-715.

MADEWELL BR, THESEN GH. Haematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions. IV. Canine. In: Theilen GH, Madewell BR. *Veterinary Cancer Medicine*, 2nd edn., Philadelphia, PA, Lea and Febiger 1987.

MASETTI R, PESSION A. First-line treatment of acute lymphoblastic leukemia with pegasparaginase. *Biologics* 2009;3:359-68.

MASSA KL, GILGER BC, MILLER TL, et al. Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000). *Vet Ophthalmol* 2002;5:93-8.

MAULDIN GE, FOX PR, PATNAIK AK, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicosis. Clinical features in 32 dogs. *J Vet Intern Med* 1992;6:82-8.

MCNEILL CJ, SORENMO UK, SHOFER SF, et al. Evaluation of adjuvant doxorubicin-based chemotherapy for the treatment of feline mammary carcinoma. *J Vet Intern Med* 2009;23:123-9.

MOORE AS, OGILVIE GK, RUSLANDER D, et al. Evaluation of mitoxantrone for the treatment of lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1994;15:1903-5.

MOORE AS, LEVEILLE CR, REIMANN KA, et al. The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. *Cancer Invest* 1995;13:475-9.

MOORE AS, COTTER SM, FRIMBERGER AE, et al. A comparison of doxorubicin and COP for maintenance of remission in feline lymphoma. *J Vet Intern Med* 1996;10:372-5.

MOORE AS, COTTER SM, RAND WM, et al. Evaluation of a discontinuous treatment protocol (VELCAP-S) for canine lymphoma. *J Vet Intern Med* 2001;15(4):348-54.

MORRISON WB. *Cancer in Dogs and Cat, Medical and Surgical Management*. 2nd edn., Jackson, WY, Teton NewMedia, 2001;641-70.

MORRISON WB. Non-Cutaneous Lymphoma. In: *Lymphoma in Dogs and Cats*. Jackson, WY, Teton NewMedia, 2005;1-96.

MYERS NC, 3rd, MOORE AS, RAND WM, et al. Evaluation of a multidrug chemotherapy protocol (ACOPA II) in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 1997;11:333-9.

NORTHRUP NC, RASSNICK KM, SNYDER LA, et al. Neutropenia associated with vincristine and L-asparaginase induction chemotherapy for canine lymphoma. *J Vet Intern Med* 2002;16:570-5.

NORTON L. A Gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Res* 1988;48:7067-71.

NORTON L, SURBONE A. Cytokinetics. In: Holland JF, Frei E, Bast RC, Kufe DW, Morton DL, Weichselbaum RR eds. *Cancer Medicine*, 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA;1996:598-617.

OGILVIE GK, VAIL DM, KLEIN MK, et al. Weekly administration of low-dose doxorubicin for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 1991;198:1762-4.

OGILVIE GK, MOORE AS, CHEN C, et al. Toxicoses associated with the administration of mitoxantrone to dogs with malignant tumors: a dose escalation study. *J Am Vet Med Assoc* 1994;205:570-3.

OGILVIE GK, MOORE AS. Paraneoplastic Syndromes In: *Managing the veterinary cancer patient*. Veterinary Learning Systems Co, Inc. Trenton, 1995;197-222.

O'KEEFE DA, SISSON DD, GELBERG HB, et al. Systemic toxicity associated with doxorubicin administration in cats. *J Vet Intern Med* 1993;7:309-17.

OWEN LN. *TNM classification of tumors of domestic animals*. 1st edn, Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1980;46-7.

PAGE RL, MACY DW, OGILVIE GK, et al. Phase III evaluation of doxorubicin and whole-body hyperthermia in dogs with lymphoma. *Int J Hyperthermia* 1992;8:187-97.

PARODI A, WYERS M, PARIS J. Incidence of canine lymphoid leukosis: age, breed and sex distribution – results of a necropsy survey. *Bibl Haematol* 1968;30:263-7.

PATNAIK AK, HURVITZ AI, JOHNSON GF. Canine gastrointestinal neoplasms. *Vet Pathol* 1977;14:547-55.

PAYNE SE, RASSNICK KM, NORTHRUP NC, et al. Treatment of vascular and soft-tissue sarcomas in dogs using an alternating protocol of ifosfamide and doxorubicin. *Vet Comp Oncol* 2003;1:171-9.

PETERSON JL, COUTO CG, HAMMER AS, et al. Acute sterile hemorrhagic cystitis after a single intravenous administration of cyclophosphamide in three dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992;201:1572-3.

PIATKOWSKA-JAKUBAS B, KRAWCZYK-KULIS M, GIEBEL S, et al. Polish Adult Leukemia Group. Use of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: recommendations of the Polish Adult Leukemia Group. *Pol Arch Med Wewn* 2008;118:664-9.

PIEK CJ, RUTTEMAN GR, TESKE E. Evaluation of the results of a L-asparaginase-based continuous chemotherapy protocol versus a short doxorubicin-based induction chemotherapy protocol in dogs with malignant lymphoma. *The Vet Quat* 1999;21:44-9.

POSTORINO NC, SUSANECK SJ, WITHROW SJ, et al. Single agent therapy with Adriamycin for canine lymphosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 1989;25:221-5.

PRICE GS, PAGE RL, FISCHER BM, et al. Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *J Vet Intern Med* 1991;5:259-62.

RASSNICK KM, MOORE AS, COLLISTER KE, et al. Efficacy of combination chemotherapy for treatment of gastrointestinal lymphoma in dogs. *J Vet Intern Med* 2009;23:317-22.

ROSENBERG MP, MATUS RE, PATNAIK AK. Prognostic factors in dogs with lymphoma and associated hypercalcemia. *J Vet Intern Med* 199;5:268-71.

ROSENTHAL RC. Epidemiology of canine lymphosarcoma. *Comp Cont Edu* 1984;4:855-60.

ROSENTHAL RC. Lymphoma in dogs, in *Veterinary Oncology Secrets*, Hanley & Belfus, Philadelphia, 2001;179-85.

ROSIN A. Neurologic diseases associated with lymphosarcoma in ten dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1982;181:50-53.

ROWINSKY EK. Antimicrotubule Agents. In: Chabner BA, Longo DL. *Cancer Chemotherapy & Biotherapy. Principles and Practice*, 4th edn., Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins 2006;237-83.

RUSLANDER DA, GEBHARD DH, TOMPKINS MB, et al. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo* 1997; 11:169-72.

SAPIERZYNSKI R, MICUN J. Lymphadenomegaly in dogs-cytological study. *Pol J Vet Sci* 2009;12:263-8.

SAUERBREY ML, MULLINS MN, BANNINK EO, et al. Lomustine and prednisone as a first-line treatment for dogs with multicentric lymphoma: 17 cases (2004-2005). *J Am Vet Med Assoc* 2007;230:1866-9.

SCOTT M. Muller and Kirk's *Small Animal Dermatology* 6th edn., W.B. Saunders Company 2001;1330-40.

SIMON D, NOLTE I, EBERLE N, et al. Treatment of dogs with lymphoma using a 12-week, maintenance-free combination chemotherapy protocol. *J Vet Intern Med* 2006;20:948-54.

SIMON D, SCHOENROCK D, BAUMGÄRTNER W, et al. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *J Vet Intern Med* 2006;20:1184-90.

SORENMO UK, BAEZ JL, CLIFFORD CA, et al. Efficacy and toxicity of a dose-intensified doxorubicin protocol in canine hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med* 2004;18:209-13.

STARRAK GS, BERRY CR, PAGE RL, et al. Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. *Vet Radiol Ultrasound*. 1997;38:411-8.

TESKE E. Canine malignant lymphoma: A review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Quart* 1994(16);4:209-19.

TESKE E, VAN HEERDE P, RUTTEMANN GR, et al. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1994;205:1722-8.

TESKE E, VAN STRATEN G, VAN NOORT R, et al. Chemotherapy with cyclophosphamide, vincristin and prednisolone (COP) in cats with malignant lymphoma: new results with an old protocol. *J Vet Intern Med* 2002;16:179-86.

VAIL DM, KISSEBERTH WC, OBRADOVICH JE, et al. Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol* 1996;24:807-15.

VAIL DM, YOUNG KM. Canine lymphoma and lymphoid leukemia. In: Withrow SJ, MacEwen EG *Small Animal Clinical Oncology*, 4th edn., Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company 2007;699-733.

VALERIUS KD, OGILVIE GK, FETTMAN MJ, et al. Comparison of the effects of asparaginase administered subcutaneously versus intramuscularly for treatment of multicentric lymphoma in dogs receiving doxorubicin. *J Am Vet Med Assoc* 1999;214:353-6.

VALLI VE, JACOBS RM, PARODI AL, et al. Histologic classification of hematopoietic tumors of domestic animals. Washington, DC. Armed Forces Institute of Pathology and World Health Organization collaborating Center for Worldwide References on Comparative Oncology, 2002.

VALLI VE, VERNAU W, DE LORIMIER LP, et al. Canine indolent nodular lymphoma. *Vet Pathol*, 2006;43:241-56.

VAUGHAN A, JOHNSON JL, WILLIAMS LE. Impact of chemotherapeutic dose intensity and hematologic toxicity on first remission duration in dogs with lymphoma treated with a chemoradiotherapy protocol. *J Vet Intern Med* 2007;21:1332-9.

VICKERY KR, WILSON H, VAIL DM, et al. Dose-escalating vinblastine for the treatment of canine mast cell tumour. *Vet Comp Oncol* 2008;6:111-9.

WANG KY, PANCIERA DL, AL-RUKIBAT RK, et al. Accuracy of ultrasound-guided fine-needle aspiration of the liver and cytologic findings in dogs and cats: 97 cases (1990-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2004;224:75-8.

WORKING FORMULATION. [No authors listed] National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for

clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer*, 1982;49:2112-35.

ZEMANN BI, MOORE AS, RAND WM, et al. A combination chemotherapy protocol (VELCAP-L) for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 1998;12(6):465-70.

VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AgNOR	argyrophil nucleolar organizer regions
CHOP-Protokoll	C für Cyclophosphamid, H für Hydroxy-Daunorubicin = Doxorubicin, O für Oncovin = Vincristin und P für Prednisolon
CR	complete remission
DISC-Protokoll	Dosis intensivierendes simultanes Chemotherapie Protokoll
DNA	Desoxyribonukleinsäure
IU	international units
IV	intravenös
MDR	multi drug resistance
NCI	National Cancer Institute
PAAR	PCR for antigen receptor rearrangement
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	progressive disease
PO	per os
PR	partial remission
PTHrP	Parathormon ähnliches Protein
REAL Klassifikation	Revised European American Lymphoma Klassifikation
RNA	Ribonukleinsäure
SC	subkutan
SD	stable disease
VCOG-CTCAE	Veterinary Co-Operative Oncology Group's common terminology criteria for adverse events
VELCAP-S-Protokoll	V für Vincristin, EL für L-Asparaginase, C für Cyclophosphamid, A für Adriamycin = Doxorubicin und P für Prednison; S für 'short'
WHO	World Health Organization
ZNS	zentrales Nervensystem

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank geht an

Herrn Univ. Prof. Dr. Johannes Hirschberger, meinem Doktorvater und Betreuer, der durch seinen wertvollen fachlichen Rat, seine Unterstützung, seine Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt durch das Bereitstellen des notwendigen Arbeitsmaterials diese Doktorarbeit erst möglich gemacht und zu ihrem Gelingen beigetragen hat. Er war mir stets Mentor und Förderer und hat in kreativen Diskussionen maßgeblichen Einfluss auf meine fachliche und wissenschaftliche Entwicklung genommen und den Fortschritt und die Qualität dieser Arbeit entscheidend vorangetrieben.

Meinen Eltern und meiner Schwester, die während der gesamten Zeit immer für mich da waren und mich sowohl materiell als auch seelisch-moralisch immer unterstützt haben.

Tom, der sich immer und jederzeit sowohl um mein seelisches als auch leibliches Wohl (Danke an den besten Koch der Welt!) gekümmert hat und ohne den ich nicht komplett wäre.

Lisa und Tina, meinen Freundinnen, die mich sowohl fachlich als auch seelisch-moralisch in jeder Lebenslage und zu jeder Zeit unterstützt haben; bei denen ich jederzeit Aufmunterung, Trost oder Ablenkung finden konnte.

Mimi und Nicky, meine beiden speziellen Doktorandinnen und Freundinnen, die mir in der Klinik den Rücken frei gehalten haben und bei denen ich jederzeit Ablenkung vom Doktorarbeitsstress finden konnte.

Die Abteilung für Onkologie, mein Team, für das tolle Arbeitsklima, die Unterstützung in allen Angelegenheiten der Onkologie und manche Freizeitgestaltung.