

Glioblastoma multiforme in dogs

Urbańska K.¹, Sokołowska J.¹, Szmidt M.¹, Grodzik M.², Sysa P.¹, Department of Morphological Science, Faculty of Veterinary Medicine¹, Department of Animal Nutrition and Feed Science, Faculty of Animal Sciences², Warsaw University of Life Science – SGGW

The aim of this paper was to characterize glioblastoma multiforme, a rapidly growing tumor of the cerebral hemispheres. Glioblastoma multiforme is the most common central nervous system tumor recognized in animals. The World Health Organization (WHO) current classification of primary brain tumors lists glioblastoma multiforme as a grade IV astrocytoma. The major features of this tumor are cell polymorphism, high mitotic activity, necrotic areas and proliferation of blood vessels. Clinical symptoms of glioblastoma multiforme results from tumor localization and its advanced stage at the time of diagnosis. Anticancer treatment includes surgery, radiotherapy, gene therapy and vaccine therapy. Dogs are considered as an animal model for human glioblastoma multiforme in the investigations of novel anticancer therapies.

Keywords: glioblastoma multiforme, tumor, dog.

Zachorowalność na pierwotne nowotwory mózgu dotyczy 14,5 na 100 000 psów oraz 3,5 na 100 000 kotów (1). Wśród nich najczęściej rozpoznawanym jest glejak wielopostaciowy – agresywny nowotwór o niekorzystnym rokowaniu. Aktualnie obowiązująca klasyfikacja histologiczna nowotworów układu nerwowego u zwierząt stworzona została w oparciu o kryteria wyznaczone przez Światową Organizację Zdrowia (WHO). Pierwszą wyodrębnioną w niej grupą są nowotwory pochodzenia neuroepitelialnego, do których zalicza się nowotwory astrocytarne (w tym glejaka wielopostaciowego), skąpowypustkowe, glejowe mieszane, wyściółkowe, nowotwory ze splotu naczyńiówkowego, neuronalne i mieszane neuronalno-glejowe, zarodkowe oraz nowotwory wywodzące się z mięszu szyjki. Grupa druga obejmuje nowotwory opon mózgowo-rdzeniowych, zaś do kolejnych zaklasyfikowano chłoniaki i nowotwory układu krwiotwórczego, nowotwory okolicy siodła tureckiego, torbiele i zmiany nowotworopodobne, a także przerzuty tych nowotworów, guzy szerzące się przez ciągłość i nowotwory obwodowego układu nerwowego. Ocena stopnia zaawansowania histopatologicznego nowotworów ośrodkowego układu nerwowego uwzględnia ich budowę histologiczną, indeks proliferacji, odpowiedź na leczenie i czas przeżycia. Rozróżnia się 4 histopatologiczne stopnie złośliwości tych nowotworów (2). Stopień I obejmuje nowotwory

Glejak wielopostaciowy u psów

Kaja Urbańska¹, Justyna Sokołowska¹, Maciej Szmidt¹, Marta Grodzik², Paweł Sysa¹

z Katedry Nauk Morfologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej oraz Katedry Żywności Zwierząt i Gospodarki Paszowej Wydział Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie

niezłośliwe, II przypisany jest nowotworom względnie niezłośliwym, III określa nowotwory względnie złośliwe, a stopień IV charakteryzuje nowotwory złośliwe, gdzie szacowany okres przeżycia pacjentów wynosi 6–12 miesięcy. Glejak wielopostaciowy ma według WHO 4 stopień złośliwości (3).

Glejaki wielopostaciowe stanowią jednorodną pod względem genetycznym i fenotypowym grupę nowotworów. Cechują się naciekającym charakterem wzrostu, dlatego też ich całkowita resekcja nie jest możliwa, a radioterapia nie zawsze skuteczna (4). Pierwotne glejaki wielopostaciowe rozwijają się z prawidłowych komórek gleju na drodze wieloetapowej onkogenezy, glejaki wtórne powstają z guzów o niższym stopniu złośliwości i mają wolniejsze tempo wzrostu (5). Zwiększeniu stopnia złośliwości tych nowotworów towarzyszy zwiększenie atypii jądrowej, nadbarwność jąder komórkowych, wzrost indeksu mitotycznego, pojawienie się obszarów martwicy i naczyń krwionośnych o nietypowej budowie histologicznej (6). Choć genetyczne uwarunkowania rozwoju pierwotnych i wtórnych glejaków, podobnie jak szlaki molekularne prowadzące do ich powstania są odmienne (4), to w obrazie histologicznym nie wykazują one różnic morfologicznych (7). Przerzuty glejaka wielopostaciowego zdarzają się rzadko i dotyczą śledziony, opłucnej, płuc, węzłów chłonnych, wątroby, kości, jelita cienkiego i trzustki (8, 9, 10, 11, 12, 13). Przypuszcza się, że niewielka zdolność glejaka wielopostaciowego do dawania przerzutów jest wynikiem bariery utworzonej przez opony miękkie, jak również, z uwagi na agresywny przebieg choroby, krótkiego czasu jej trwania (14). W dostępnej literaturze nie stwierdzono opisu przypadku wystąpienia przerzutu glejaka wielopostaciowego u zwierząt oraz nie napotkano informacji dotyczących wystąpienia u nich wtórnego glejaka wielopostaciowego.

W medycynie weterynaryjnej najwięcej przypadków występowania glejaka wielopostaciowego opisano u psów. Szczególnie predysponowane do zachorowania na ten typ nowotworu są rasy brachyceficzne, głównie bokserzy i boston terierzy, choć opisano także jego występowanie u cocker spaniela, owczarka staroangielskiego, pointera, rottweilera, mieszaneńców (15) i buldoga (16). U kotów glejak wielopostaciowy występuje rzadziej i dlatego

w literaturze temu gatunkowi zwierząt poświęca się nieporównywalnie mniej uwagi (17). Znane są również przypadki rozpoznania glejaka wielopostaciowego u krów, świń (18), papug – rudosterki czerwonołeciej (19) i papużki falistej (20) oraz jeża biało-brzuchego (afrykańskiego; 21). Istnieją też nieliczne prace z zakresu histopatologii weterynaryjnej poświęcone opisowi przypadków wystąpienia glejaka wielopostaciowego u małp (22).

Glejak wielopostaciowy może występować u psów w każdym wieku, ale najczęściej rozpoznaje się go u osobników starszych, powyżej 8 roku życia. U psów nie wykazano predyspozycji płciowych do zachorowania na ten typ nowotworu. Szczegółowa etiopatogeneza glejaków wielopostaciowych u tego gatunku także nie została poznana. Nowotwór ten lokalizuje się w półkulach mózgu, międzymózgowiu (15), mózdzku lub pniu mózgu (23), naciekając zdrową tkankę nerwową mózgu, stąd zazwyczaj nie jest wyraźnie odgraniczony od tkanki prawidłowej (24).

W zależności od umiejscowienia guza oraz stopnia zaawansowania choroby, do najczęstszych objawów klinicznych glejaka wielopostaciowego należą: przechylenie głowy, zmiany w zachowaniu, brak apetytu, ślinienie się, niebezpieczność ruchów, zaburzenia ruchu, otepianie. W badaniu neurologicznym stwierdza się niedowład połowiczny, nieprawidłową postawę zwierzęcia, opuszczenie głowy, brak odruchu gardłowego lub obniżenie czucia bólu części twarzowej (23). Zwrócono także uwagę na powiązanie zespołu Hornera z występowaniem glejaka wielopostaciowego u psów (16).

Rodzaj objawów glejaka wielopostaciowego powoduje, że u zwierząt nowotwór ten rozpoznaje się przede wszystkim *post mortem*, mikroskopowo, przy użyciu tradycyjnych metod histologicznych i technik immunohistochemicznych. Histopatologiczna ocena morfologii guza dokonywana jest w oparciu o kryteria określone przez WHO (25). Przyżyciowe rozpoznanie neuropatologiczne przeprowadza się m.in. na podstawie wyników badania materiału cytologicznego pobranego drogą biopsji stereotaktycznej (23, 26), a także wykonując badania obrazowe (tomografię komputerową i rezonans magnetyczny), które pozwalają na wczesne wykrycie tego nowotworu, oszacowanie wielkości

guza i podjęcie decyzji o leczeniu psa (23). Coraz częściej zwraca się uwagę na przydatność wykonywania biopsji pod kontrolą tomografu komputerowego (26). W płynie mózgowo-rdzeniowym psów z glejakiem wielopostaciowym stwierdza się znaczną liczbę erytrocytów i komórek jądrzastych, głównie granulocytów obojętnochłonnych i limfocytów (27).

Histopatologicznie glejak wielopostaciowy składa się z komórek o niewielkich rozmiarach, cechujących się polimorfizmem, anaplazją i anizokariozą znacznego stopnia (16, 23). Komórki glejaka wielopostaciowego mają kwasochłonną cytoplazmę, owalne lub wydłużone jądro komórkowe z licznymi, położonymi centralnie lub mimośrodkowo, jąderkami oraz niewyraźne granice międzykomórkowe (16, 27). W utkaniu guza obecne są także wielojądrzaste komórki olbrzymie, liczne obszary rozrostu naczyniowego, a także pola wylewów krwi. Komórki glejaka wielopostaciowego psów wykazują ekspresję receptorów naskórkowego czynnika wzrostu – EGF i czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego – VEGF (23). Obecność nacieków komórek nowotworowych stwierdza się w całym obszarze mózgu. W obrazie histologicznym guza zauważalny jest także naciek komórek zapalnych, makrofagów i limfocytów T (28).

Glejak wielopostaciowy cechuje się wysoką aktywnością proliferacyjną. Jednym ze sposobów oceny tempa proliferacji komórek nowotworu jest ocena ekspresji antygenu Ki-67. W przypadku glejaka wielopostaciowego metoda ta jest użyteczna, gdy rozpoznanie typu nowotworu pochodzenia glejowego nie jest jednoznaczne, a także gdy patolog dysponuje niewielkim wyinkiem guza lub jego obszarem marginalnym o niskiej gęstości komórek. Ponadto w chorobach nowotworowych ocenę aktywności Ki-67 uznaje się za marker prognostyczny (29). Indeks proliferacji glejaka wielopostaciowego psów znajduje się w przedziale 6–26% wszystkich komórek nowotworowych. Potwierdzeniem wysokiej aktywności proliferacyjnej komórek glejaka jest także obecność dużej liczby figur mitotycznych (23). Średnia liczba figur mitotycznych u psów w 1 polu widzenia wynosi od 3 (26) do 6 (16).

Charakterystyczną cechą glejaka wielopostaciowego jest obecność ognisk martwicy z przylegającymi do nich obszarami pseudopalisadowymi, które utworzone są przez promieniście układające się wrzecionowate komórki gleju. W tym rejonie obserwuje się obecność szczególnie licznych komórek ulegających apoptozie (23). Apoptoza komórek glejaka wielopostaciowego może być indukowana przez czynniki mikrośrodowiska rozwijającego się guza, np. miejscowe niedotlenienie, dlatego też

przypuszcza się, że wysoka wartość indeksu apoptotycznego tego nowotworu może być wynikiem nie tylko jego wysokiej aktywności proliferacyjnej, ale także obecności rozległych obszarów objętych martwicą (30).

Weryfikację pierwotnego rozpoznania, jak również rozpoznanie różnicowe przeprowadza się w oparciu o immunohistochemiczne potwierdzenie obecności charakterystycznego kwaśnego białka włóknikowego – GFAP (glial fibrillary acidic protein; 23), które jest białkiem strukturalnym filamentów pośrednich cytoszkieletu astrocytów (31, 32) o masie cząsteczkowej 50 kD (33). Jest to najbardziej swoisty marker astrocytów, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w patologii. Uważa się, że białko to pełni rolę w procesie dojrzewania astrocytów. Wraz ze wzrostem stopnia złośliwości nowotworów pochodzenia astrocytarnego obserwuje się postępującą utratę jego ekspresji (34). Tak dzieje się w przypadku glejaka wielopostaciowego. Komórki niewykazujące ekspresji GFAP proliferują szybciej w porównaniu do komórek pozytywnie barwiących się. Utrata ekspresji GFAP świadczy o znacznym niezróżnicowaniu komórek nowotworowych i nie musi stanowić wyznacznika progresji i rozwoju guza (32). Ekspresja białka GFAP w komórkach glejaka wielopostaciowego psów jest zróżnicowana (28). Badania de Viott i wsp. (16) nie wykazały ekspresji GFAP i cytokeratyny, a jedynie obecność wimentyny w komórkach nowotworowych, podczas gdy w badaniach Lipsitz i wsp. (23) wszystkie 5 pobranych od psów glejaków wielopostaciowych wykazywało silną ekspresję GFAP i wimentyny. W materiale pobranym metodą biopsji stereotaktycznej ekspresję GFAP w komórkach glejaka wielopostaciowego psa stwierdzono w 15% komórek (26).

Wyniki prezentowane w licznych doniesieniach literaturowych wskazują na udział genu *TP53* w progresji nowotworów. Gen *TP53*, zwany także strażnikiem genomu, u ludzi zlokalizowany jest w prążku 13,1 krótkiego ramienia chromosomu 17 (35), natomiast u psów umiejscowiony jest w chromosomie 5 (36). W komórkach glejaka wielopostaciowego psów stwierdza się nadekspresję białka TP53 (15). W warunkach fizjologicznych produkt genu *TP53* – białko TP53 (forma dzika) zapobiega namnażaniu się komórek o uszkodzonym genomie bezpośrednio (przez uczestniczenie w mechanizmach naprawy DNA) lub pośrednio (przez zahamowanie cyklu komórkowego lub aktywację szlaków proapoptotycznych). Okres półtrwania dzikiej formy TP53 jest krótki i dlatego też immunohistochemiczna identyfikacja tego białka jest niemożliwa. W wyniku mutacji *TP53* powstaje białko pozbawione

funkcji supresorowej, które gromadzi się na terenie jądra komórkowego (35, 37). Białko to jest dużo bardziej stabilne, ma dłuższy okres półtrwania i dlatego można je wykrywać w komórkach nowotworowych (35). W komórkach glejaka wielopostaciowego często stwierdza się mutacje genu *TP53*. Sugeruje się jednak, że nie zawsze obecność TP53 w komórkach nowotworowych musi być związana z mutacją w genie kodującym to białko (37). Wyższy poziom mutacji genu *TP53* występuje w glejakach wtórnych, jak również w glejakach zawierających $\geq 5\%$ wielojądrzastych komórek olbrzymich. Podjęto także próby scharakteryzowania zmian na poziomie DNA chorych psów. W 1 z 12 analizowanych przypadków stwierdzono mutację somatyczną (substytucję pojedynczego nukleotydu ACT \rightarrow GCT) genu *TP53*, w kodonie 253 eksonu 7. W obrazie immunohistochemicznym tego przypadku wykazano nadekspresję białka TP53 i brak ekspresji EGFR (15).

Leczenie przeciwnowotworowe psów ze zdiagnozowanym glejakiem wielopostaciowym obejmuje zabieg chirurgiczny, radioterapię, a także terapię genową i szczepionkową (38). Analizy porównawcze struktury histologicznej guzów pobranych śródoperacyjnie od psów i człowieka nie wykazują istotnych różnic. Stało się to podstawą do uznania psa jako zwierzęcego modelu tego nowotworu u ludzi, wykorzystywanego m.in. w badaniu nowych strategii terapeutycznych wobec nowotworów mózgu człowieka. Na szczególną uwagę zasługuje wykorzystanie psów do sprawdzania skuteczności działania nanocząstek liposomalnych (zawierających inhibitor topozomerazy CPT-11), przy wykorzystaniu metody zwiększonego konwekcyjnego dostarczania leku (convection-enhanced delivery – CED; 39).

Piśmiennictwo

- Moore M.P., Bagley R.S., Harrington M.L., Gavin P.R.: Intracranial tumours. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 1996, **26**, 759-777.
- Katsetos C.D., Dráberová E., Legido A., Dumontet C., Dráber P.: Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. Class III beta-tubulin. *J. Cell Physiol.* 2009, **221**, 505-513.
- Kleihues P., Soylemezoglu F., Schäuble B., Scheithauer B.W., Burger P.C.: Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia* 1995, **5**, 211-221.
- Karcher S., Steiner H.H., Ahmadi R., Zoubaa S., Vasvari G., Bauer H., Unterberg A., Herold-Mende C.: Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas. *Int. J. Cancer* 2006, **118**, 2182-2189.
- Tso C.L., Freije, W.A., Day A., Chen Z., Merriman B., Perlina A., Lee Y., Dia E.Q., Yoshimoto K., Mischel P.S., Liu L.M., Cloughesy T.F., Nelson S.F.: Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res.* 2006, **66**, 159-167.
- Biernat W.: Molekularne podłoże progresji złośliwości glejaków rozlanych ośrodkowego układu nerwowego. *Onkol. Pol.* 1999, **2**, 113-119.
- Kleihues P., Ohgaki H.: Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro. Oncol.* 1999, **1**, 44-51.

8. Wallace C.J., Forsyth P.A., Edwards D.R.: Lymph node metastases from glioblastoma multiforme. *Am. J. Neuro-radiol.* 1996, **17**, 1929-1931.
9. Jamjoom A.B., Jamjoom Z.A.B., Ur-Rahman N., Al-Rikabi A.C.: Cervical lymph node metastasis from a glioblastoma multiforme in a child: Report of a case and a review of the literature. *Ann. Saudi. Med.* 1997, **17**, 340-343.
10. al-Rikabi A.C., al-Sohaibani M.O., Jamjoom A., al-Rayess M.M.: Metastatic deposits of a high-grade malignant glioma in cervical lymph nodes diagnosed by fine needle aspiration (FNA) cytology--case report and literature review. *Cytopathology* 1997, **8**, 421-427.
11. Widjajaa A., Mixa H., Gólkela C., Flemming P., Egensperger R., Holsteinf A., Rademaker J., Beckere H., Hundta M., Wagnera S., Mannsa M.P.: Uncommon metastasis of a glioblastoma multiforme in liver and spleen. *Digestion* 2000, **61**, 219-222.
12. Mujica A., Hunnb A., Taylorc A.B., Lowenthald R.M.: Extracranial metastases of a glioblastoma multiforme to the pleura, small bowel and pancreas. *J. Clin. Neurosci.* 2006, **13**, 677-681.
13. Robert M.C., Wastie M.L.: Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases. *Biomed. Imaging Interv. J.* 2008, **4**, 1-4.
14. Tysnes B.B., Mahesparan R.: Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *J. Neurooncol.* 2001, **53**, 129-147.
15. Stoica G., Kim H.T., Hall D.G., Coates J.R.: Morphology, immunohistochemistry and genetic alterations in dog astrocytomas. *Vet. Pathol.* 2004, **41**, 10-19.
16. de Viott A., Ecco R., Silva C.M.O., Fulgêncio G.O., Melo E.G.: Langohr I.M.: Horner's syndrome associated with glioblastoma multiforme in a dog. *Braz. J. Vet. Pathol.* 2010, **3**, 118-122.
17. Sato T., Nakamura A., Shibuya H., Shirai W., Koie H.: Cerebral high-grade astrocytoma (glioblastoma) in a cat. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 2003, **50**, 269-271.
18. Fankhauser R., Luginbühl H., McGrath J.T.: Tumours of the nervous system. *Bull. World Health Organ.*, 1974, **50**, 53-69.
19. Carleton R.E., Garner M.M., Nayden D.: Malignant astrocytoma with characteristics of a glioblastoma multiforme in a green-cheeked conure (*Pyrrhura molinae*). *J. Avian Med. Surg.* 2004, **18**, 106-110.
20. Raphael B.L., Clemmons R.M., Nguyen H.T.: Glioblastoma multiforme in a budgerigar. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1980, **177**, 923-925.
21. Gibson C.J., Parry N.M.A., Jakowski R.M., Eshar D.: Anaplastic astrocytoma in the spinal cord of an African pygmy hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Vet. Pathol.* 2008, **45**, 934-938.
22. Porter B.F., Summers B.A., Leland M.M., Hubbard G.B.: Glioblastoma multiforme in three baboons (*Papio spp.*). *Vet. Pathol.* 2004, **41**, 424-428.
23. Lipsitz D., Higgins R.J., Kortz G.D., Dickinson P.J., Bollen A.W., Naydan D.K., LeCouteur R.A.: Glioblastoma multiforme: clinical findings, magnetic resonance imaging, and pathology in five dogs. *Vet. Pathol.* 2003, **40**, 659-669.
24. Zhen L., Yufeng C., Zhenyu S., Lei.: Multiple extracranial metastases from secondary glioblastoma multiforme: a case report and review of the literature. *J. Neuro-oncol.* 2010, **99**, 165-176.
25. Koestner A., Bilzer T., Schulman F.Y., Summers B.A., Winkle Van T.J.: *World Health Organization. International classification of tumor of domestic animals.* Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, DC, 1999.
26. Vernau K.M., Higgins R.J., Bollen A.W., Jimenez D.F., Anderson J.V., Koblik P.D., LeCouteur R.A.: Primary canine and feline nervous system tumors: intraoperative diagnosis using the smear technique. *Vet. Pathol.* 2001, **38**, 47-57.
27. Lenz S.D., Janovitz E.B., Lockridge K.: An anaplastic astrocytoma (glioblastoma) in the cerebellum of a dog. *Vet. Pathol.* 1991, **28**, 250-252.
28. Candolfi M., Curtin J.F., Nichols W.S., Muhammad A.G., King G.D., Pluhar G.E., McNeil E.A., Ohlfest J.R., Freese A.B., Moore P.F., Lerner J., Lowenstein P.R., Castro M.G.: Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J. Neurooncol.* 2007, **85**, 133-148.
29. Schröder R., Bien K., Kott R., Meyers I., Vössing R.: The relationship between Ki-67 labeling and mitotic index in gliomas and meningiomas: demonstration of the variability of the intermitotic cycle time. *Acta Neuropathol.* 1991, **82**, 389-394.
30. Steinbach J.P., Weller M.: Apoptosis in gliomas: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J. Neurooncol.* 2004, **70**, 245-254.
31. Baba H., Nakahira K., Morita N., Tanaka F., Akita H., Ike-naka K.: GFAP gene expression during development of astrocyte. *Dev. Neurosci.* 1997, **19**, 49-57.
32. Wilhelmsson U., Eliasson C., Bjerkvig R., Pekny M.: Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. *Oncogene* 2003, **22**, 3407-3411.
33. Messing A., Brenner M.: GFAP: functional implications gleaned from studies of genetically engineered mice. *Glia* 2003, **43**, 87-90.
34. Rutka J.T., Murakami M., Dirks P.B., Hubbard S.L., Becker L.E., Fukuyama K., Jung S., Tsugu A., Matsuzawa K.: Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J. Neurosurg.* 1997, **87**, 420-430.
35. Nayak A., Ralte A.M., Sharma M.C., Singh V.P., Mahapatra A.K., Mehta V.S., Sarkar C.: p53 protein alterations in adult astrocytic tumors and oligodendrogliomas. *Neurol. India* 2004, **52**, 228-232.
36. Guevara-Fujita M.L., Loechel R., Venta P.J., Yuzbasiyan-Gurkan V., Brewer G.J.: Chromosomal assignment of seven genes on canine chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Mamm. Genome* 1996, **7**, 268-270.
37. Newcomb E.W., Madonia W.J., Pisharody S., Lang F.F., Koslow M., Miller D.C.: A correlative study of p53 protein alteration and p53 gene mutation in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol.* 1993, **3**, 229-235.
38. Pluhara, G.E., Grogand P.T., Seilera C., Goularta M., Santacruz K.S., Carlson C., Chenc W., Olinc M.R., Lowenstein P.R., Castrof M.G., Hainese S.J., Ohlfest J.R.: Anti-tumor immune response correlates with neurological symptoms in a dog with spontaneous astrocytoma treated by gene and vaccine therapy. *Vaccine* 2010, **28**, 3371-3378.
39. Dickinson P.J., LeCouteur R.A., Higgins R.J., Bringas J.R., Larson R.F., Yamashita Y., Krauze M.T., Forsayeth J., Noble C.O., Drummond D.C., Kirpotin D.B., Park J.W., Berger M.S., Bankiewicz K.B.: Canine spontaneous glioma: A translational model system for convection-enhanced delivery. *Neuro. Oncol.* 2010, **12**, 928-940.