

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

Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Als gemeinsames Projekt mit dem Institut Experimentelle Onkologie und
Therapieforschung der Technischen Universität München

Direktor: Prof. Dr. Bernd Gänsbacher

Nonviraler Gentransfer des feline Zytokin-Gens GM-CSF mittels Magnetofektion als neoadjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze

Eine klinische Phase-II-Studie

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

von

Florian Markus Walsch

aus München

München 2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hirschberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Göbel

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Das feline Fibrosarkom.....	3
1.1.	Pathogenese	4
1.2.	Vorkommen.....	7
1.3.	Klinik.....	7
1.4.	Histologie	8
1.5.	Metastasierungsverhalten	9
1.6.	Diagnose.....	10
1.7.	Staging und Grading.....	10
1.8.	Therapie.....	10
1.8.1.	Chirurgie.....	11
1.8.2.	Radiotherapie	11
1.8.3.	Chemotherapie	12
1.8.4.	Multimodale Therapie	13
1.8.5.	Immuntherapie	14
2.	Tumorimmunologie.....	16
2.1.	Tumorantigene	17
2.2.	Major Histocompatibility Complex	17
2.2.1.	MHC-Klasse-I-Komplexe	18
2.2.2.	MHC-Klasse-II-Komplexe.....	18
2.3.	Effektorzellen der Tumorimmunität.....	18
2.3.1.	T-Lymphozyten.....	19
2.3.2.	Natürliche Killerzellen	20
2.3.3.	Antigenpräsentierende Zellen	21
2.4.	Zytokine	21
2.4.1.	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor	21
2.4.2.	Weitere Zytokine.....	23
2.5.	Tumor escape Mechanismen.....	23
3.	Gentherapie zur Immunstimulation.....	24
4.	Vektoren für den Gentransfer	25

5.	Magnetofektion.....	26
III.	MATERIAL UND METHODEN	29
1.	Studiengrundlagen	29
1.1.	Studiendesign	29
1.2.	Patientenrekrutierung	29
1.3.	Einschlusskriterien	30
1.4.	Ausschlusskriterien	31
2.	Studienablauf.....	31
2.1.	Aufnahmeuntersuchung	31
2.2.	Zeitplan.....	34
2.3.	Herstellung der Injektionslösung	35
2.4.	Intratumorale Injektion und Magnetofektion	36
2.5.	Operation und postoperative Phase	38
2.6.	Zytologische und histopathologische Untersuchung.....	40
2.7.	Kontrolluntersuchungen	40
2.8.	Abschlussuntersuchung	41
3.	Studienauswertung.....	41
3.1.	Auswahl der Kontrollgruppe	41
3.2.	Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe	41
3.3.	Beurteilung von Nebenwirkungen	42
3.4.	Statistische Auswertung der Effektivität.....	47
IV.	ERGEBNISSE	49
1.	Patientengut	49
1.1.	Therapiegruppe.....	49
1.2.	Kontrollgruppe	51
2.	Vergleich der Gruppen	53
2.1.	Vergleich nach Alter	53
2.2.	Vergleich nach Gewicht	54
2.3.	Vergleich nach Geschlecht.....	56
2.4.	Vergleich nach Tumorlokalisation	57
2.5.	Vergleich nach Tumorstaging	57
3.	Toxizität.....	57

3.1.	Blutparameter	60
3.1.1.	Blutbildveränderungen	60
3.1.1.1.	Hämoglobinabfall.....	60
3.1.1.2.	Hämatokritabfall.....	61
3.1.1.3.	Thrombozyten	61
3.1.1.4.	Leukozyten	62
3.1.1.5.	Monozytose	63
3.1.1.6.	Lymphozyten.....	63
3.1.1.7.	Neutrophile Granulozyten.....	64
3.1.1.8.	Eosinophilie.....	65
3.1.1.9.	Basophilie.....	65
3.1.2.	Veränderungen im Serumprofil.....	66
3.1.2.1.	Erhöhung der Aspartat-Amino-Transferase	66
3.1.2.2.	Erhöhung des Bilirubins.....	67
3.1.2.3.	Albuminabfall.....	67
3.1.2.4.	Erhöhung des Kreatinins	68
3.1.2.5.	Hyperglykämie	68
3.2.	Anamnestisch und klinisch erfasste Nebenwirkungen.....	69
3.2.1.	Allergische Reaktion	69
3.2.2.	Gewichtsverlust.....	70
3.2.3.	Lethargie.....	70
3.2.4.	Hyperthermie.....	71
3.2.5.	Anorexie	71
3.2.6.	Vomitus	72
3.2.7.	Kotabsatz.....	72
3.2.8.	Wundheilungsstörung.....	73
4.	Effektivität	74
4.1.	Betrachtung der Therapiegruppe	74
4.2.	Betrachtung der Kontrollgruppe.....	75
4.3.	Überlebenszeitanalyse	77
V.	DISKUSSION	78
1.	Das Fibrosarkom als Gegenstand der Forschung.....	78
2.	Krebsimmuntherapie als alternative Behandlungsform	79

3.	Nonviraler Gentransfer	79
4.	Magnetofektion.....	80
5.	Intratumorale Injektion.....	81
6.	Nebenwirkungen	82
7.	Rezidivrate	86
8.	Schlussbetrachtung	87
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	89
VII.	SUMMARY.....	91
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	93
IX.	ANHANG	113
X.	DANKSAGUNG	130

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Amino-Transferase
CTCAE	<i>common terminology criteria for adverse events</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
fe	felines
FeLV	Felines Leukämievirus
FeSV	Felines Sarkomvirus
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FIV	Felines Immundefizienz-Virus
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
hu	humanes
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	mittleres Erythrozyteneinzelvolumen
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MTD	maximal tolerierbare Dosis

PEI	Polyethylenimin
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RNA	Ribonukleinsäure
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
T4	Thyroxin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor

I. EINLEITUNG

Das feline Fibrosarkom stellt aus verschiedenen Gründen eine besondere Herausforderung für Tierärzte in der gegenwärtigen veterinärmedizinischen Praxis dar. Hierbei handelt es sich um einen Bindegewebstumor, der zu den häufigsten und bösartigsten Neoplasien der Katze zählt und aufgrund seiner hohen Rezidivrate nur schwer therapierbar ist. Zudem kann es bei seinem Auftreten zu Konfliktsituationen zwischen Tierarzt und Tierbesitzer kommen, da eine iatrogene Komponente in Form von Injektionen und der daraus entstehenden Entzündungsreaktion nachweislich eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung spielt.

Bei alleiniger chirurgischer Tumorexstirpation werden aufgrund des stark infiltrativ wachsenden Tumors Rezidivraten von bis zu 70 % beobachtet. Zwar lässt sich die Rezidivrate mit einer adjuvanten Radiotherapie deutlich senken, doch ist dies mit einem hohen logistischen und finanziellen Aufwand und mit Nebenwirkungen für den Patienten verbunden.

Das Projekt „Immunologische Gentherapie des feline Fibrosarkoms“ der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München hat es sich zur Aufgabe gemacht, nach einer praxistauglichen, adjuvanten Behandlungsmethode zu suchen. So werden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München bereits seit 1999 Studien durchgeführt, die das Ziel einer Immunstimulation mittels Zytokinen verfolgen.

In der dieser Arbeit vorausgegangenen Phase-I-Studie kam das spezieseigene Zytokinen für den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) zum Einsatz. Zur Steigerung der Transfektionsrate wurde das Prinzip der Magnetofektion angewendet. Ziel war es, eine maximal tolerierbare Dosis (MTD) festzulegen und das Auftreten von möglichen Nebenwirkungen zu erfassen. In der höchsten Dosisstufe von 1250 µg GM-CSF wurden nur milde Nebenwirkungen beobachtet, so dass diese als MTD festgelegt wurde.

Ziel der vorliegenden Phase-II-Studie ist:

1. die Überprüfung der Verträglichkeit der Therapie mit Hilfe eines Nebenwirkungskatalogs
2. der Nachweis einer signifikanten Wirkung der Therapie im Vergleich mit einer Kontrollgruppe

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das feline Fibrosarkom

Fibrosarkome sind maligne mesenchymale Neoplasien des Bindegewebes und werden zu den Weichteilsarkomen gezählt. Bei der Katze gehören Fibrosarkome zu den häufigsten Tumoren überhaupt (KESSLER, 2005) und stellen mit über 40 % den größten Anteil der feline Hauttumoren dar (STIGLMAIR-HERB, 1987).

Ätiologisch lassen sich bei Katzen vier verschiedene Gruppen von Fibrosarkomen unterscheiden (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001):

1. Feline Sarkomvirus (FeSV)-induzierte Fibrosarkome
2. Intraokuläre posttraumatische Fibrosarkome
3. Injektions-assoziierte Fibrosarkome
4. Fibrosarkome anderer Ätiologie

FeSV-induzierte Fibrosarkome und intraokuläre posttraumatische Fibrosarkome unterscheiden sich von den anderen zwei Gruppen nicht nur in ihrer Ursache sondern auch in ihrer Prognose und empfohlenen Therapie.

So treten Fibrosarkome, die durch das Feline Sarkomvirus induziert werden, als multiple Umfangsvermehrungen sowohl in der Haut als auch in inneren Organen auf (KAADEN, 2002) und lassen wegen der damit verbundenen ungünstigen Prognose von einer Therapie absehen (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001).

Intraokuläre posttraumatische Fibrosarkome, welchen meist eine Traumatisierung des Bulbus vorausgeht, werden hingegen mit einer radikalen Bulbusexstirpation therapiert, wobei der *Nervus opticus*, an dem der Tumor in der Regel entlang wächst, mitentfernt werden muss (DUBIELZIG et al., 1990).

Injektions-assoziierte Fibrosarkome und Fibrosarkome anderer Ätiologie, bei deren Ursache zahlreiche Tumorgenese-faktoren in Betracht kommen, gleichen sich sowohl in ihrem biologischen Verhalten, als auch in Therapie und Prognose (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001). Lediglich die von Entzündungszellen, Nekrose und lokaler Infiltration der Tumorzellen geprägte Histologie (DODDY et

al., 1996; MADEWELL et al., 2001) und das geringere Alter der Patienten unterscheiden Injektions-assoziierte Fibrosarkome von denen anderer Ätiologie (HENDRICK et al., 1994). Da die vorliegende Studie die Therapie nur dieser beiden Tumorgruppen zum Thema hat, wird im Folgenden nur noch auf diese eingegangen.

1.1. Pathogenese

Im Jahr 1987 wurde im US-Bundesstaat Pennsylvania ein Gesetz erlassen, welches die Impfung gegen Tollwut bei Katzen vorschrieb. Schon wenige Jahre später wurde ein vermehrtes Auftreten von Fibrosarkomen in der dortigen Katzenpopulation beobachtet, welches relativ bald mit der im Zuge des Gesetzes gesteigerten Impfpraxis in Verbindung gebracht wurde (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991). Das gehäufte Auftreten an den für Impfungen typischen Injektionsstellen wie Interscapulärregion oder laterale Thoraxwand untermauerten diese Theorie (HENDRICK & DUNAGAN, 1991). Als schließlich in mehreren Tumorbiopsien Aluminium, welches als Impfadjuvans Verwendung findet, in den den Tumor umgebenden Makrophagen nachgewiesen wurde, konnte ein gesicherter kausaler Zusammenhang zwischen Impfung und Tumorentstehung hergestellt werden (HENDRICK et al., 1992; HENDRICK & BROOKS, 1994; MADEWELL et al., 2001). Nachdem erst nur Vakzinen gegen Tollwut oder das Feline Leukämievirus mit der Entstehung von Fibrosarkomen in Verbindung gebracht wurden (HENDRICK et al., 1992; KASS et al., 1993; HENDRICK et al., 1994; ESPLIN et al., 1996; COYNE et al., 1997), fanden sich schließlich Hinweise, dass auch Impfungen gegen Panleukopenie oder Rhinotracheitis mit einer Tumorentstehung in Zusammenhang stehen könnten (HENDRICK et al., 1994; LESTER et al., 1996; BURTON & MASON, 1997; COYNE et al., 1997; MCENTEE & PAGE, 2001). Dies führte letztendlich dazu, dass im Jahr 1999 alle adjuvantienhaltigen Impfstoffe für Katzen von der Weltgesundheitsorganisation als kanzerogen eingestuft wurden (MCNIEL, 2001). Dass aber nicht nur diese Impfstoffe zu einer Tumorentstehung führen können, sondern auch solche welchen kein Adjuvans zugefügt wurde, zeigten KASS und Mitarbeiter bereits in einer epidemiologischen Studie aus dem Jahr 1993. Außerdem beobachteten sie, dass das Risiko ein Fibrosarkom zu entwickeln bei einmaliger Impfung um 50 %, bei zweimaliger Impfung am selben Ort um 127 % und bei drei- und viermaliger Impfung am selben Ort um 175 % anstieg (KASS et al., 1993). DAY und

Mitarbeiter verglichen in einer 2007 veröffentlichten Studie das histopathologische Erscheinungsbild von Injektionsstellen, welche einerseits von adjuvantienhaltigen Impfstoffen und andererseits von adjuvantienfreien Impfstoffen stammten. Hierbei zeigte sich ein signifikant höheres Auftreten von Entzündungszeichen bei Katzen, die adjuvantienhaltige Impfstoffe erhalten hatten (DAY et al., 2007). Neben Impfungen gelten auch Injektionen mit anderen Stoffen als tumorinduzierend. Somit liegen bereits einige Fallberichte vor, in denen die Injektion von langsam resorbierbaren Antibiotika, Methylprednisolon und Lufenuron zur Tumorentstehung geführt haben (ESPLIN et al., 1999; GAGNON, 2000; COHEN et al., 2001; KASS et al., 2003). In der Regel liegt zwischen Injektion und Tumorentstehung ein Zeitraum von drei Monaten bis zu drei Jahren (KASS et al., 1993; MACY & HENDRICK, 1996). Aber nicht nur Injektionen scheinen mit der Entstehung von feline Fibrosarkomen in Verbindung zu stehen. So veröffentlichten BURACCO und Mitarbeiter im Jahr 2002 einen Fallbericht über ein Fibrosarkom, welches im Bereich einer tiefen nicht resorbierbaren Naht entstanden war (BURACCO et al., 2002). Auch über die Entstehung von Fibrosarkomen am Applikationsort von lokalen Ektoparasitika (DYER et al., 2007), am Implantationsort eines Mikrochips (DALY et al., 2008) und im Bereich eines intraoperativ vergessenen Tupfers (HADDAD et al., 2010) existieren inzwischen Fallberichte.

Der Zusammenhang zwischen Injektion und Tumorentstehung wird in einer der Tumorgenese vorausgehenden persistierenden Entzündungsreaktion vermutet. So scheinen Injektionen zu einer übersteigerten entzündlichen oder immunologischen Reaktion zu führen, welche schließlich als persistierende Entzündung zu einem unkontrollierten Wachstum von Myofibroblasten und Fibroblasten führt (HENDRICK et al., 1994; MACY & HENDRICK, 1996; HENDRICK, 1998, 1999; MCENTEE & PAGE, 2001). Gestützt wird diese These durch den histopathologischen Nachweis des Übergangs von entzündungsbedingten Granulomen zu Sarkomen (HENDRICK et al., 1994). Eine individuelle Prädisposition scheint eine Tumorentstehung zu begünstigen (DE MAN & DUCATELLE, 2007).

Ob eine genetische Komponente wirklich eine zusätzliche Rolle spielt, wurde in mehreren Studien untersucht. Beschrieben wurden sowohl Hyperdiploidien des gesamten Chromosomensatzes, als auch Monosomien und Trisomien einzelner

Chromosomen (KALAT et al., 1991; MAYR et al., 1991; MAYR et al., 1994). Auch Chromosomenmutationen wie Translokationen und Deletionen konnten nachgewiesen werden (MAYR et al., 1996). Ebenfalls war die Untersuchung auf Veränderungen am p53-Tumorsuppressor-Gen, dessen Mutation zum unkontrollierten Zellzyklus und somit zur Tumorentstehung führen kann, Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (MAYR et al., 1995; MAYR et al., 1998; MAYR et al., 2000; NAMBIAR et al., 2000; NAMBIAR et al., 2001; NIETO et al., 2003; HERSHEY et al., 2005; BANERJI & KANJILAL, 2006). So konnten HERSHEY und Mitarbeiter für Katzen, bei denen eine p53-Mutation im Zytoplasma der Tumorzelle stattfand, eine schlechtere Prognose bezüglich der Rezidivrate nachweisen, als für Katzen, die denen die Mutation im Zellkern auftrat (HERSHEY et al., 2005). Auch BANERJI und KANJILAL konnten einen prognostischen Wert für Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens feststellen. Sie beobachteten einen Zusammenhang zwischen Mutation und erhöhter Rezidivrate beziehungsweise verkürzter Überlebenszeit (BANERJI & KANJILAL, 2006). Somit könnten Genanalysen bei gesunden Katzen in der Lage sein, das Risiko für die Entwicklung eines Fibrosarkoms abzuschätzen (BANERJI et al., 2007). In einer Studie von PETTERINO und Mitarbeitern konnte eine Korrelation zwischen der Expression des zytoplasmatischen Transkriptionsfaktors *signal transducers and activators of transcription 3* (STAT3) und dem histologischen Grad des Fibrosarkoms festgestellt werden (PETTERINO et al., 2006). Auch der Nachweis der Matrix-Metalloproteinasen MMP2 und MT-MMP16 in Fibrosarkomen konnte mit der Überlebenszeit der Katzen in Korrelation gesetzt werden (SORENSEN et al., 2004). Sowohl HENDRICK als auch NIETO und Mitarbeiter wiesen eine Überexpression von Wachstumsfaktoren in Tumorzellen und in den die Tumorzellen umgebenden Lymphozyten nach, welche bei Überexpression in entzündetem Gewebe zur Tumorentstehung beitragen könnten. Hierbei konnte der *platelet-derived growth factor* (PDGF) und sein Rezeptor (PDGFR), der *epidermal growth factor* (EGF) und sein Rezeptor (EGFR), der *fibroblast growth factor* β (FGF- β) und der *transforming growth factor* α und β (TGF- α , TGF- β) identifiziert werden (HENDRICK, 1998, 1999; NIETO et al., 2003). Bereits 1998 konnte von HENDRICK das Proto-Onkogen c-jun in Injektions-assoziierten Fibrosarkomen aufgefunden werden. Dieses Gen kodiert für ein Protein, dessen Beitrag zu zellulärer Proliferation und Onkogenese in vitro nachgewiesen wurde

(HENDRICK, 1998, 1999). CERRUTI und Mitarbeiter fanden in ihrer Studie in feline Fibrosarkomen im Vergleich zu gesundem Gewebe eine erhöhte Expression von zwei katalytischen Untereinheiten von Immunoproteasomen, welche zu Störungen in der Tumorantigenpräsentation und somit zu einer Tumorentstehung führen könnten (CERRUTI et al., 2007).

Eine Beteiligung von Viren an der Entstehung von Injektions-assoziierten Fibrosarkomen wird ausgeschlossen (ELLIS et al., 1996; KIDNEY et al., 2000, 2001b; KIDNEY et al., 2001c; KIDNEY et al., 2001a; KIDNEY et al., 2002).

Ein mehrstufiges Karzinogenesemodell inklusive genetischer, iatrogener und lokaler Faktoren scheint die plausibelste Erklärung für die Entstehung des Tumors zu sein (KIRPENSTEIJN, 2006).

1.2. Vorkommen

Die Angaben über die Häufigkeit des Auftretens von Injektions-assoziierten Fibrosarkomen schwanken zwischen 0,63 und 3,6 pro 10.000 geimpfter Katzen, wobei sich die Angaben nur auf die USA und Kanada beziehen (KASS et al., 1993; COYNE et al., 1997; GOBAR & KASS, 2002). Durch Studien belegte Angaben über die Häufigkeit in Deutschland oder Europa existieren bisher noch nicht. Das Durchschnittsalter von Katzen mit Injektions-assoziierten Fibrosarkomen liegt bei acht Jahren. Bisher konnte weder eine Rasse- noch eine Geschlechtsprädisposition festgestellt werden (HENDRICK et al., 1994; DODDY et al., 1996).

1.3. Klinik

Injektions-assoziierte Fibrosarkome finden sich vor allem an den klassischen Impfstellen wie Interscapulärregion, dorsolaterale Brustwand, Lumbaregion, Abdominalregion, Gliedmaßen und in den *Musculi semimembranosus* und *semitendinosus* (HENDRICK et al., 1994; DODDY et al., 1996; DAVIS et al., 2007a; SHAW et al., 2009). Dort sind sie meist als derbe, nicht schmerzhaft und mehr oder weniger bewegliche Masse in der Subkutis lokalisiert und sind trotz makroskopisch guter Abgrenzbarkeit durch ein stark infiltratives Wachstum entlang der Faszien charakterisiert (DUBIELZIG et al., 1993; HENDRICK & BROOKS, 1994; DODDY et al., 1996; HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001; HIRSCHBERGER & HUTTINGER, 2010). Abbildung 1 zeigt ein Fibrosarkom an der für Impfungen typischen Lokalisation zwischen den Schulterblättern.



Abbildung 1: Fibrosarkom einer Katze an interscapulärer Lokalisation (Aus dem Foto-Archiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)

1.4. Histologie

Charakteristisch ist das Auftreten pleomorpher Spindelzellen, mehrkerniger Riesenzellen und histiozytärer Zellen (HENDRICK & BROOKS, 1994; MADEWELL et al., 2001). Neben einer zentralen Nekrose wurden mehrfach auch Myofibroblasten und fibroblastenartige Zellen beschrieben, die eine Pseudokapsel um den Tumor zu bilden scheinen (HENDRICK & BROOKS, 1994; MADEWELL et al., 2001; COUTO et al., 2002). Typischerweise wird das maligne Geschehen von einer durch folliculäre T-Lymphozytenaggregate und Plasmazellen gekennzeichneten Entzündungsreaktion begleitet. Auch von Makrophagen aufgenommenes Aluminium kann als blau-graues Material gelegentlich identifiziert werden (HENDRICK & BROOKS, 1994; MADEWELL et al., 2001; COUTO et al., 2002; DEIM et al., 2008). Obwohl die meisten Injektions-assoziierten Sarkome histopathologisch als Fibrosarkome diagnostiziert werden, treten auch Osteosarkome, Chondrosarkome, Rhabdomyosarkome, Myxosarkome, myofibroblastische Sarkome und maligne fibröse Histozytome auf (DUBIELZIG et al., 1993; ESPLIN et al., 1993; HENDRICK & BROOKS, 1994; MACY & BERGMANN, 1995; DODDY et al., 1996; MACY & HENDRICK, 1996; MADEWELL et al., 2001). Abbildung 2 zeigt das für Fibrosarkome typische histopathologische Bild pleomorpher Spindelzellen.

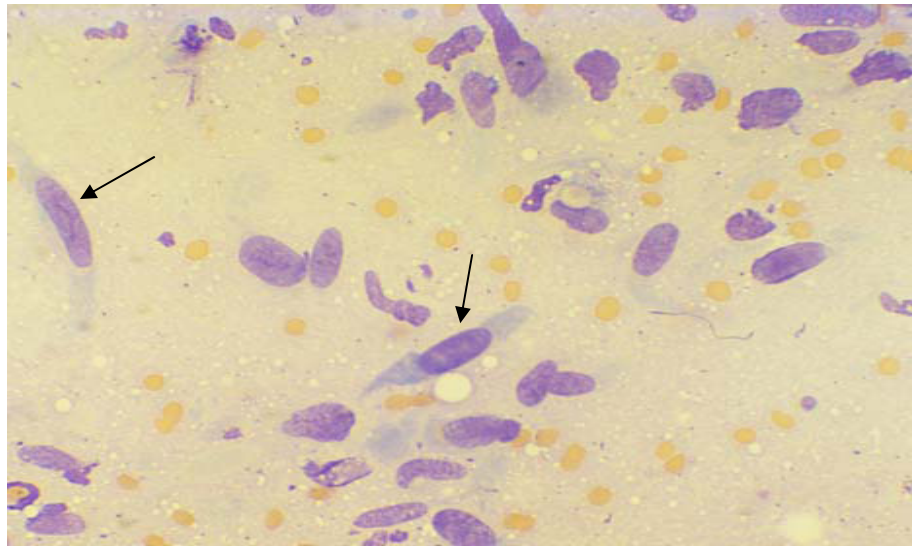


Abbildung 2: Spindelzellen in einem Tumorabkratzpräparat, modifizierte Wright-Färbung (Aus dem Foto-Archiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)

1.5. Metastasierungsverhalten

Die Metastasierungswahrscheinlichkeit wird zwischen 10 % und 28 % angegeben (COUTO & MACY, 1998; HERSHEY et al., 2000), wobei sie bei Primärtumoren nur bei 5 % zu liegen scheint (HERSHEY et al., 2000). Die primären Metastasierungsorte sind hierbei die Lungen (siehe Abbildung 3), gefolgt von den regionären Lymphknoten, den Nieren, der Milz, dem Darm und der Leber (SANDLER et al., 1997; KOBAYASHI et al., 2002).

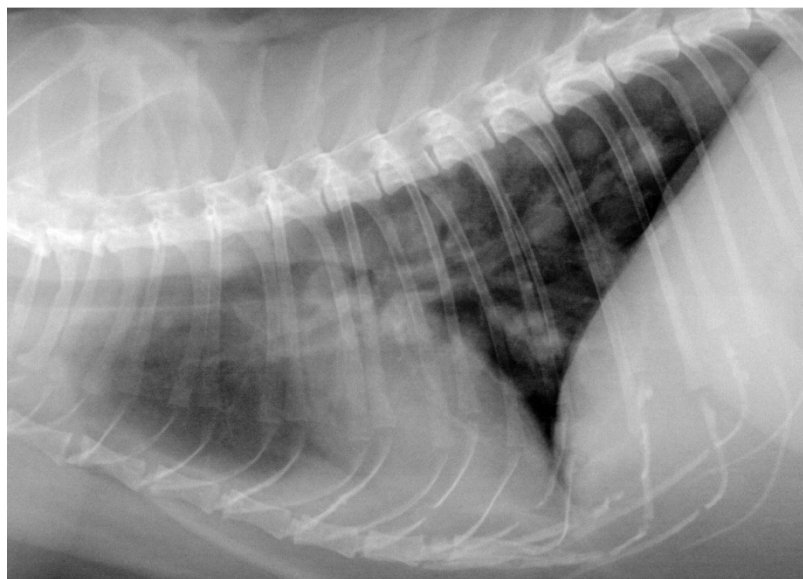


Abbildung 3: Multiple Lungenmetastasen einer Katze mit Fibrosarkom, Thorax laterolateral (Aus dem Foto-Archiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)

1.6. Diagnose

Nach den Richtlinien der *vaccine-associated feline sarcoma task force* ist jede Umfangsvermehrung genau zu untersuchen, wenn sie mindestens eine der drei Kriterien erfüllt: Länger als drei Monate nach einer Injektion zu bestehen, mehr als zwei Zentimeter im Durchmesser groß zu sein oder einen Monat nach einer Injektion zu wachsen (VAFSTF, 1999). Zuallererst sollte eine Feinnadelaspirationszytologie durchgeführt werden. Sowohl für die Diagnosefindung als auch um andere Tumoren, Hämatome oder Abszesse auszuschließen, erweist sie sich als schnelle, kostengünstige und minimalinvasive Methode (HIRSCHBERGER & HUTTINGER, 2010). Da die Feinnadelaspirationszytologie nicht immer diagnostisch ist, ist im Zweifelsfall eine Biopsie durchzuführen (SEGUIN, 2002; HIRSCHBERGER & HUTTINGER, 2010).

1.7. Staging und Grading

Zur Stadieneinteilung sollten Hämatologie, klinische Chemie, Röntgenaufnahmen vom Thorax und Ultraschallaufnahmen vom Abdomen durchgeführt werden (HIRSCHBERGER & HUTTINGER, 2010). Um die Dimensionen des Tumors für eine Operation oder Bestrahlung besser abschätzen zu können, erweist sich sowohl die Computertomographie als auch die Magnetresonanztomographie als hilfreich, da die alleinige palpatorische Beurteilung meist zu einer zu geringen Abschätzung der Tumorgröße führt (MCENTEE, 2000). Eine Klassifizierung erfolgt nach dem von HIRSCHBERGER und KESSLER entwickelten TNM-System für feline Fibrosarkome (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001).

Häufig werden Injektions-assoziierte Fibrosarkome nach einem aus der Humanmedizin auf Hunde übertragenen System in Grade eingeteilt (KUNTZ et al., 1997). Ein prognostischer Nutzen konnte aber bisher nicht daraus gezogen werden (COUTO et al., 2002; ROMANELLI et al., 2008). Histopathologische Untersuchungen haben gezeigt, dass weitere Malignitätsmerkmale in die histologische Beurteilung aufgenommen werden müssen, um einen prädiktiven Wert zu erhalten (KAMENICA et al., 2008; GIUDICE et al., 2009).

1.8. Therapie

Im Folgenden wird ein Überblick über die Behandlungsmöglichkeiten und Erfolgsaussichten für das feline Fibrosarkom gegeben. Hierbei wird neben den

klassischen Therapieoptionen wie Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie besonders auf die Immuntherapie eingegangen.

1.8.1. Chirurgie

Mit Werten von bis zu 70 % ist die Rezidivrate bei alleiniger chirurgischer Therapie sehr hoch (BOSTOCK & DYE, 1979; MCENTEE & PAGE, 2001), wobei es vor allem in den ersten sechs Monaten nach der Operation zum Rezidiv kommt (HENDRICK et al., 1994). Der langfristige Behandlungserfolg scheint maßgeblich von der Radikalität der Operation abzuhängen (KOBAYASHI et al., 2002). So ermittelten HERSHEY und Mitarbeiter eine mediane rezidivfreie Zeit von nur 66 Tagen bei marginaler Operation. Weiträumige Tumorexstirpation hingegen, führte zu einer medianen rezidivfreien Zeit von 425 Tagen (HERSHEY et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Studie von CRONIN und Mitarbeitern, bei der postoperativ die Exzisionsränder nach dem Vorhandensein von Tumorzellen untersucht wurden. Hierbei lag die rezidivfreie Zeit bei 112 Tagen bei unsauberem Schnittträndern, hingegen bei 700 Tagen bei sauberem Schnittträndern (CRONIN et al., 1998).

Empfohlen wird eine *en-bloc*-Tumorexstirpation mit einem Sicherheitsabstand von mindestens drei Zentimetern zu den Seiten und mindestens einer gesunden Faszienschicht- oder Muskelschicht zur Tiefe hin (SEGUIN, 2002; GRÖSSLINGER et al., 2003; DAVIS et al., 2007b). Anschließend sollte eine histopathologische Untersuchung des entfernten Gewebes erfolgen. Trotz radikaler Operation und der histopathologischen Bestätigung tumorfreier Ränder werden immer noch Rezidivraten von bis zu 50 % erreicht (MCENTEE & PAGE, 2001).

1.8.2. Radiotherapie

Begleitend zu einer chirurgischen Tumorentfernung hat sich die Radiotherapie, welche sowohl präoperativ als auch postoperativ durchgeführt werden kann, als sehr wirkungsvoll erwiesen.

Hierbei wurden nach präoperativer Bestrahlung Rezidivraten von 41 % bis 54 % und mediane rezidivfreie Zeiten von 398 bis 584 Tagen erreicht (CRONIN et al., 1998; COHEN et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2002).

STEGGER-LIEB und Mitarbeiter ermittelten bei Katzen, welche postoperativ bestrahlt wurden, eine Rezidivrate von 44 % und eine mediane rezidivfreie Zeit

von 422 Tagen (STEGGER-LIEB et al., 2002). Eine mediane Überlebenszeit von 43 Monaten und ein medianes progressionsfreies Intervall von 37 Monaten beobachteten ECKSTEIN und Mitarbeiter bei 46 postoperativ bestrahlten Katzen (ECKSTEIN et al., 2009). Ein unmittelbarer Beginn der Bestrahlungstherapie nach der Operation ist für längere Rezidivzeiten und eine längere Gesamtüberlebenszeit am effektivsten (COHEN et al., 2001). Zudem scheint eine postoperative Bestrahlungstherapie gegenüber der präoperativen Bestrahlung von Vorteil zu sein. So beobachteten MAYER und Mitarbeiter in ihrer retrospektiven Studie bei Katzen mit präoperativer Bestrahlung eine mediane Überlebenszeit von nur 310 Tagen, während Katzen mit postoperativer Bestrahlung eine mediane Überlebenszeit von 705 Tagen aufwiesen (MAYER et al., 2009).

Radiotherapie ohne chirurgische Tumorentfernung hingegen ist nur zu palliativmedizinischen Zwecken zu empfehlen (OGILVIE, 2001).

1.8.3. Chemotherapie

Der klinische Effekt der Chemotherapie bei der Behandlung des felinen Fibrosarkoms ist bis heute umstritten. Grund ist der Mangel an prospektiven, randomisierten und kontrollierten Studien in diesem Bereich.

MARTANO und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie für Katzen, die adjuvant Doxorubicin erhalten hatten, keinen gesteigerten Therapieerfolg feststellen (MARTANO et al., 2005).

Eine Studie von POIRIER und Mitarbeitern hingegen wies einen signifikanten Unterschied bezüglich rezidivfreier Zeit bei Katzen nach, die zusätzlich zur Operation Doxil oder Doxorubicin erhalten hatten. So lag der Wert von 388 Tagen deutlich über dem von 93 Tagen, der für eine „historische“ Kontrollgruppe ermittelt wurde. Desweiteren beobachteten sie bei 33 Katzen, welche nicht operiert wurden, in fünf Fällen komplette und in acht Fällen partielle Remissionen (POIRIER et al., 2002).

Komplette und partielle Remissionen bei nichtresezierbaren Fibrosarkomen konnten in anderen Studien auch mit Ifosfamid, Carboplatin und einer Kombination aus Doxorubicin und Cyclophosphamid erreicht werden (BARBER et al., 2000; RASSNICK et al., 2006).

Die in Fibrosarkomen nachgewiesene Überexpression von PDGF und PDGFR führte in zwei weiteren Studien zum Einsatz von Imatinib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, der kompetitiv und selektiv den PDGFR hemmt. Hierbei wurde sowohl eine Hemmung der PDGFR-Tyrosin-Kinase in feline Fibrosarkomzellen *in vitro*, als auch eine Stabilisierung der Tumorgröße für zwei Monate *in vivo* beobachtet (KATAYAMA et al., 2004; LACHOWICZ et al., 2005).

Auch die Elektrochemotherapie, eine Methode bei der die Aufnahme von Chemotherapeutika in die Zelle und somit ihre Wirksamkeit verbessert werden soll, war Gegenstand zweier Untersuchungen mit Bleomycin. Hierbei wurde eine durch lokale elektrische Impulse gesteigerte Permeabilität der Zellmembran und somit eine erhöhte Bleomycin-Konzentration im Bereich der Desoxyribonukleinsäure (DNA) erwartet. Als Monotherapie wurde eine Stabilisierung des Tumorwachstums für einen Zeitraum von bis zu sieben Monaten beobachtet und eine Verlängerung der Überlebenszeit von 0,8 auf 6,1 Monate erreicht (MIR et al., 1997). SPUGNINI und Mitarbeiter beobachteten in ihrer Studie eine rezidivfreie Zeit von 12 Monaten bei Katzen, denen die Elektrochemotherapie intraoperativ verabreicht wurde und eine von 19 Monaten bei Katzen, die sie postoperativ erhielten. Die Kontrollgruppe, die allein chirurgisch behandelt wurde, erreichte lediglich vier Monate rezidivfreie Zeit (SPUGNINI et al., 2007).

1.8.4. Multimodale Therapie

Um den therapeutischen Effekt einer chirurgischen Tumorentfernung mit adjuvanter Radiotherapie noch zu steigern, wurde in mehreren Studien zusätzlich eine Chemotherapie verabreicht. Eine vor der Radiotherapie verabreichte Chemotherapie soll hierbei die Empfindlichkeit der Tumorzellen für die Bestrahlung steigern (SEGUIN, 2002).

HAHN und Mitarbeiter beobachteten bei Katzen mit inkompletter Tumorsektion eine mediane rezidivfreie Zeit von 15,4 Monaten, wenn sie zusätzlich zur Bestrahlung eine Chemotherapie erhielten. Katzen, die postoperativ nur einer Bestrahlung unterzogen wurden, erreichten in der gleichen Studie lediglich 5,7 Monate rezidivfreie Zeit (HAHN et al., 2007). Auch KING und Mitarbeiter berichten in ihrer Studie von einer Steigerung der medianen rezidivfreien Zeit von 162 Tagen auf 360 Tage, wenn Katzen zusätzlich eine Chemotherapie erhielten.

Ein Verlängerung der mittleren Überlebenszeit konnte hingegen nicht festgestellt werden (KING et al., 2001). Weder eine Veränderung in der Rezidivrate noch in der medianen rezidivfreien Zeit noch in der medianen Überlebenszeit konnte in drei weiteren Studien, welche die Wirkung multimodaler Therapie untersuchten, festgestellt werden. Hierbei kamen Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin und Carboplatin neben Chirurgie und Radiotherapie zum Einsatz (BREGAZZI et al., 2001; COHEN et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2002).

1.8.5. Immuntherapie

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse bei den herkömmlichen Therapieformen rückte die Immuntherapie immer mehr in das Interesse der Forscher und wurde zum Gegenstand einiger Studien. So wurde bereits in den frühen Neunzigern die unspezifische Immunstimulation mit Acemannan, einem Pflanzenalkaloid der *Aloe vera*, untersucht. Die Fallzahlen von fünf beziehungsweise drei Katzen waren aber zu gering, um eine Aussage über die Wirksamkeit von Acemannan treffen zu können (KENT, 1993; KING et al., 1995).

HAMPEL und Mitarbeiter untersuchten in ihrer Studie die Wirkung von rekombinantem Interferon- ω (IFN- ω), einem Typ-I Interferon, welches prä- und postoperativ in den Tumor beziehungsweise in das Wundgebiet injiziert wurde. Sowohl die Nebenwirkungen als auch die Rezidivrate mit 45 % erwiesen sich bei dieser Studie als sehr niedrig. Jedoch lässt die Tatsache, dass 85 % der behandelten Katzen einen Tumor von weniger als drei Zentimetern Größe im Durchmesser hatten und die Studie unkontrolliert war, keine objektive Interpretation zu (HAMPEL et al., 2007). Eine über einen längeren Zeitraum wiederholte Verabreichung des rekombinanten Interferons sollte, wie in der Humanmedizin üblich, Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Bemerkenswert und vielversprechend sind die Forschungsergebnisse im Bereich der immunologischen Gentherapie:

QUINTIN-COLONNA und Mitarbeiter untersuchten in einer 1996 publizierten Studie die Wirkung von humanem Interleukin-2 (huIL-2) sezernierenden histoinkompatiblen Stammzellen, welche zusätzlich zu Chirurgie und Radiotherapie siebenmal postoperativ in das subkutane Wundgebiet injiziert wurden. 16 Monate nach der Tumorexstirpation wiesen nur 31 % der therapierten

16 Katzen ein Rezidiv auf und eine mediane Überlebenszeit von 16 Monaten wurde ermittelt. In der Kontrollgruppe, welche nur chirurgisch und radiotherapeutisch behandelt wurde, fand sich dagegen in 69 % der Fälle ein Rezidiv 16 Monate *post operationem* und auch die mediane Überlebenszeit war mit 8 Monaten nur halb so lang wie in der genterapeutisch behandelten Gruppe (QUINTIN-COLONNA et al., 1996).

JOURDIER und Mitarbeiter benutzten in ihrer Studie virale Vektoren (Kanarienvogel- oder Vacciniaviren), welche entweder humanes oder felines IL-2 exprimieren sollten. Neben Chirurgie und Radiotherapie wurden die Vektoren siebenmal subkutan injiziert. Nach einem Jahr ergab sich für die mit huIL-2 behandelten Katzen eine Rezidivrate von 39 % und für die mit feIL-2 behandelten Katzen von nur 28 %. Die Kontrollgruppe, die nur chirurgisch und radiotherapeutisch behandelt wurde, erreichte hingegen eine Rezidivrate von 61 % (JOURDIER et al., 2003).

Auch die im Jahr 2007 von SIDDIQUI und Mitarbeitern veröffentlichte Phase-I-Studie untersuchte die Anwendung der immunologischen Genterapie mit Hilfe viraler Vektoren (Adenoviren). Darin kam der durch Hyperthermie zu aktivierende Hitzeschock-Promotor 70B zum Einsatz, welcher zur Expression von IL-12 führen sollte (SIDDIQUI et al., 2007).

Adenovirale Vektoren kamen auch in zwei Phase-I-Studien der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München zum Einsatz. So wurden in der Studie von WIELAND Katzen in der ersten Woche *post operationem* fünfmal huIL-2- und felines Interferon- γ (feIFN- γ)-exprimierende Adenoviren subkutan verabreicht. Die Toxizität blieb hierbei gering und äußerte sich nur in der höchsten Dosisgruppe (WIELAND, 2002). In der Studie von WIEDMANN wurde derselbe adenovirale Vektor verabreicht, wobei er nun zweimalig intratumoral injiziert wurde. In der höchsten Dosis wurde bei den Patienten sowohl eine Reduktion von Gewicht, Hämatokrit, Leukozyten- und Thrombozytenzahlen als auch Temperaturanstiege beobachtet (WIEDMANN, 2005).

In drei weiteren Phase-I-Studien der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München kamen Plasmide als Vektoren zum Einsatz. KEMPF untersuchte die Anwendung von intraoperativ in das Tumorgebiet eingesetzten

Kollagenschwämmen, auf denen die Plasmidvektoren aufgebracht waren. Neben dem bereits in den vorigen Studien eingesetzten feIFN- γ kamen hierbei auch die feline Zytokingene IL-2 und Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) zur Anwendung. Bis auf geringgradige Lymphozytopenien konnten keine Toxizitäten festgestellt werden (KEMPF, 2005). Die Anwendung der drei feline Zytokingene IFN- γ , IL-2 und GM-CSF war auch Gegenstand der Untersuchungen von JAHNKE und Mitarbeitern. Im Gegensatz zur vorigen Studie wurde auf die Implantation eines Kollagenschwammes verzichtet und die Magnetofektion zur Optimierung des Gentransfers eingesetzt. In der höchsten Dosis wurde keine Toxizität festgestellt, so dass diese als maximal tolerierbare Dosis (MTD) festgelegt wurde (JAHNKE et al., 2007). Auch HÜTTINGER und Mitarbeiter nutzten in ihrer Phase-I-Studie die Magnetofektion beim Gentransfer und untersuchten die Wirkung von feline GM-CSF. Hierbei gelang ihnen ein Expressionsnachweis mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) in den Zellkulturüberständen der angezüchteten Tumoren. Aufgrund geringer Toxizitäten in der höchsten Dosis wurde eine MTD von 1250 μg GM-CSF festgelegt, welche der vorliegenden Phase-II-Studie als Grundlage dient (HUTTINGER et al., 2008).

2. Tumorimmunologie

Dass das Immunsystem in der Lage ist, sowohl Tumorzellen zu erkennen als auch zu zerstören, äußerte Paul EHRLICH erstmals in einem Vortrag, welchen er im Jahr 1909 vor Amsterdamer Studenten hielt (EHRLICH, 1909). Ein halbes Jahrhundert später formulierten BURNET und THOMAS die *immunosurveillance theory*, welche das Immunsystem als Wächter in Erkennung und Zerstörung von neoplastischen Zellen ansieht (BURNET, 1957; THOMAS, 1959). Inzwischen wird diese Theorie nur noch als ein Teil der Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzellen gesehen. Erweitert um den Punkt, dass das Immunsystem den Organismus durch die Zerstörung neoplastischer Zellen nicht nur schützt, sondern auch durch Selektionsprozesse die Tumorzellen formt, spricht man seit Anfang des 21. Jahrhunderts von *immunoediting* (DUNN et al., 2002). *Immunoediting* wird in drei Phasen unterteilt, in *elimination* (Zerstörung), *equilibrium* (Gleichgewicht) und *escape* (Entkommen) (DUNN et al., 2004).

Der Einfluss, den das Immunsystem auf das Auftreten und die Bekämpfung von

Tumorzellen hat, lässt sich an einem gehäuften Auftreten von Neoplasien bei immunsupprimierten Patienten (ROITHMAIER et al., 2007) und einer besseren Prognose bei Melanom- und Mammakarzinompatienten, deren Neoplasien stark von Lymphozyten infiltriert sind, beobachten (ELMSLIE & DOW, 1997). Auch Spontanremissionen bei Tumorpatienten ohne erfolgte Therapie, der Nachweis tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen im Tumor oder in den regionären Lymphknoten und die Dokumentation von Tumorremissionen nach dem Einsatz von Immunmodulatoren weisen auf die wichtige Rolle hin, die das Immunsystem in Bezug auf Neoplasien spielt (BERGMAN, 2001).

Maligne Zellen gelten zwar als immunogen, scheinen aber im Gegensatz zu anderen Pathogenen eine geringere Immunogenität zu besitzen (BLATTMAN & GREENBERG, 2004). T-Zellen als Teil des zellulären Immunsystems gelten als die primären Effektorzellen der Tumorbekämpfung (ELMSLIE & DOW, 1997). Dem humoralen Immunsystem hingegen, welches erst bei der Ausbildung einer Antitumorimmunität von Bedeutung zu sein scheint, wird hierbei nur eine untergeordnete Rolle zugesprochen, doch der vollkommene Beweis hierfür steht bisher immer noch aus (ELMSLIE & DOW, 1997; ARMSTRONG & HAWKINS, 2001; BERGMAN, 2009).

2.1. Tumorantigene

Tumorantigene sind Moleküle, die auf der Zelloberfläche von neoplastischen Zellen präsentiert werden. Sie lassen sich in tumorspezifische und tumorassoziierte Antigene unterteilen, wobei erstere ausschließlich von Tumorzellen gebildet werden, letztere hingegen auch von normalen Zellen, wenn auch in anderer Form exprimiert (GRAZIANO & FINN, 2005). In der Humanmedizin wurden bereits zahlreiche Tumorantigene identifiziert und kommen klinisch sowohl zur Früherkennung als auch zur Therapieüberwachung zum Einsatz, während in der Veterinärmedizin bisher erst wenige Tumorantigene identifiziert werden konnten (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001).

2.2. Major Histocompatibility Complex

Als *major histocompatibility complex* (MHC) wird eine Gruppe von Genen zusammengefasst, die Proteine (MHC-Proteinkomplexe) codieren, die sich auf der Oberfläche jeder Körperzelle befinden und für die Immunerkennung eine zentrale Rolle spielen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Präsentation von Antigenen, die

somit von den Effektorzellen des Immunsystems erkannt werden können. MHC-Proteinkomplexe werden in zwei Hauptklassen unterteilt, die sich in ihrem Aufbau, in ihrem Vorkommen und ihrer immunologischen Funktion unterscheiden (TIZARD, 2004).

2.2.1. MHC-Klasse-I-Komplexe

MHC-Klasse-I-Komplexe sind Proteinkomplexe, die sich auf der Oberfläche beinahe aller kernhaltiger Körperzellen und der meisten Tumorzellen befinden (ELMSLIE & DOW, 1997). Hier präsentieren sie kurze Peptide endogenen Ursprungs und informieren somit ihre Umgebung über die Vorgänge im Inneren der Zelle (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001). Im Fall von Krebszellen können sie Peptide präsentieren, die als Tumorantigene vom Immunsystem als körperfremd erkannt werden können (RIBAS et al., 2000). Die Erkennung erfolgt bei MHC-Klasse-I-Komplexen über zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$ T-Zellen), die hierbei zur Lyse der Tumorzellen führen können (ELMSLIE & DOW, 1997; ARMSTRONG & HAWKINS, 2001).

2.2.2. MHC-Klasse-II-Komplexe

Im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Komplexen werden MHC-Klasse-II-Komplexe nur von spezialisierten Zellen, den sogenannten antigenpräsentierenden Zellen präsentiert. Die Peptide, die auf MHC-Klasse-II-Komplexen präsentiert werden, stammen von extrazellulären Proteinen ab und müssen vor ihrer Präsentation von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und aufbereitet werden. Auch die Proteine zugrunde gegangener Tumorzellen können auf diese Weise dem Immunsystem präsentiert und von ihm als körperfremd erkannt werden (RIBAS et al., 2000). Bei MHC-Klasse-II-Komplexen erfolgt die Erkennung über T-Helferzellen ($CD4^+$ T-Zellen), die direkt oder indirekt zu einer Zerstörung von Tumorzellen führen können (ELMSLIE & DOW, 1997; ARMSTRONG & HAWKINS, 2001).

2.3. Effektorzellen der Tumormunität

Als entscheidende Zellen des Immunsystems bei der Bekämpfung von Tumoren gelten zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten (ELMSLIE & DOW, 1997).

2.3.1. T-Lymphozyten

T-Lymphozyten gelten als die eigentlichen Effektorzellen der Tumorummunität, wobei sie sowohl direkt als auch indirekt zu einer Abtötung der Tumorzellen oder zu einem Sistieren des Tumorwachstums führen können (ELMSLIE & DOW, 1997).

Zytotoxische T-Zellen interagieren mit ihrem T-Zell-Rezeptor nur mit Peptiden, die ihnen über MHC-Klasse-I-Komplexe präsentiert werden. Zu einer Aktivierung der zytotoxischen T-Zelle kommt es aber nur, wenn zusätzlich ein zweites stimulierendes Signal in Form von Kostimulations- oder Adhäsionsmolekülen vorhanden ist (VAN SEVENTER et al., 1991; RIBAS et al., 2000). Nach Aktivierung kommt es zur Lyse der Tumorzelle, welche zytotoxische T-Zellen sowohl durch Apoptoseinduktion als auch perforinmediert erreichen können (ELMSLIE & DOW, 1997; RIBAS et al., 2000).

Im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen interagieren T-Helferzellen mit ihrem T-Zell-Rezeptor nur mit Peptiden, die ihnen von antigenpräsentierenden Zellen über MHC-Klasse-II-Komplexe präsentiert werden. Aufgrund der Sekretion unterschiedlicher Zytokine und der damit verbundenen unterschiedlichen Wirkweise werden T-Helferzellen in zwei Klassen eingeteilt, in Typ1-T-Helferzellen und Typ2-T-Helferzellen. Typ1-T-Helferzellen schütten nach ihrer Aktivierung IL-12 und IFN- γ aus und aktivieren somit hauptsächlich die zelluläre Immunantwort über zytotoxische T-Zellen (TIZARD, 2004). Typ2-T-Helferzellen hingegen aktivieren hauptsächlich die humorale Immunantwort über die Ausschüttung von IL-4, IL-10 und Tumornekrosefaktor β (TNF- β), wodurch es zur Aktivierung von B-Zellen und zur Bildung von Antikörpern kommt (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001; TIZARD, 2004). T-Helferzellen sind in der Lage, sowohl zum direkten Zelltod zu führen als auch diesen indirekt über die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen mittels Zytokinen herbeizuführen (ELMSLIE & DOW, 1997). Desweiteren werden durch die Zytokinwirkung die MHC-Klasse-I-Komplex-Expression von Tumorzellen gefördert, die Sensibilität für die Lyse von Tumorzellen herabgesetzt und Makrophagen und eosinophile Granulozyten aktiviert, die durch antigenunspezifische Sekretion von Superoxiden in die Tumorumgebung das Tumorwachstum bekämpfen (ELMSLIE & DOW, 1997; PARDOLL & TOPALIAN, 1998; ARMSTRONG & HAWKINS, 2001; KLIMP et al., 2002).

Regulatorische T-Zellen haben ihre Funktion im Unterbinden oder Schwächen einer Immunantwort und schützen den Körper somit vor einer autoaggressiven Immunreaktion (PAKRAVAN et al., 2007). Hierbei unterdrücken sie die Entwicklung und Funktion von zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen, natürlichen Killerzellen und B-Zellen (CURIEL, 2007; FU et al., 2007; PAKRAVAN et al., 2007). Der Nachweis hoher Konzentrationen von regulatorischen T-Zellen in verschiedenen Tumoren (BETTS et al., 2007; PAKRAVAN et al., 2007) und die Tatsache, dass das gesteigerte Auftreten von regulatorischen T-Zellen im Tumorgebiet mit einer gesteigerten Mortalität korreliert (FU et al., 2007), sind Hinweise darauf, dass sich Tumorzellen die Funktion regulatorischer T-Zellen zu ihrem eigenen Schutz zunutze machen. Die Induktion oder lediglich die Präsenz von regulatorischen T-Zellen könnte somit für das Versagen mancher Immuntherapien in der Onkologie verantwortlich sein (CURIEL, 2007).

2.3.2. Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen stellen eine Subpopulation der Lymphozyten dar und werden aufgrund ihrer Antigenunspezifität dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Sie sind in der Lage, entartete Zellen zu erkennen und direkt abzutöten. Entscheidend hierbei ist das Vorhandensein von MHC-Molekülen auf der Oberfläche der Zielzelle. So werden Zellen lysiert, die keine oder fremde MHC-Klasse-I-Komplexe exprimieren, was besonders bei metastasierten Tumorzellen der Fall ist (COSTELLO et al., 1999; FOSS, 2002; TIZARD, 2004). Dieser Mechanismus gilt als Schutz gesunder Körperzellen gegenüber dem Immunsystem und wurde erstmals 1981 von Klas KÄRRE als *missing-self*-Hypothese formuliert (KARRE, 2008).

Eine Aktivierung der natürlichen Killerzellen erfolgt durch den Einfluss von dendritischen Zellen und ihr Wachstum wird durch die Zytokine IL-2 und IFN- γ stimuliert (TIZARD, 2004). Aktivierte natürliche Killerzellen produzieren sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Zytokine und gelten aufgrund ihres damit verbundenen Einflusses als Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem (RIBAS et al., 2000).

2.3.3. Antigenpräsentierende Zellen

Unter dem Begriff antigenpräsentierende Zellen werden Zellen zusammengefasst, bei denen die Antigenpräsentation eine wesentliche Aufgabe darstellt und die in der Lage sind, als einzige Körperzellen sowohl MHC-Klasse-I-Komplexe als auch MHC-Klasse-II-Komplexe zu präsentieren (ELMSLIE & DOW, 1997). Zu den antigenpräsentierenden Zellen werden B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen gezählt, wobei letztere von besonderer Bedeutung für die Antigenpräsentation sind (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001). Nach Aufnahme eines Antigens wandern die antigenpräsentierenden Zellen in die regionären Lymphknoten ein und präsentieren den dort befindlichen T-Zellen das Antigen über ihre MHC-Proteinkomplexe (BLATTMAN & GREENBERG, 2004).

Neben ihrer Aufgabe als antigenpräsentierende Zellen können Makrophagen auch anderweitig eine antitumoröse Wirkung entfalten. Unter dem Einfluss von IFN- γ und GM-CSF werden von ihnen lysosomale Enzyme und Sauerstoffradikale freigesetzt, die Tumorzellen unspezifisch zerstören können (KLIMP et al., 2002; TIZARD, 2004).

2.4. Zytokine

Zytokine sind Glykoproteine, die vom Körper gebildet werden und deren Hauptaufgabe die Regulation des Wachstums und die Ausdifferenzierung von Zellen ist. Gleiche Zytokine können auf eine Vielzahl von Zellen wirksam sein und unterschiedliche Zytokine können ähnliche Effekte haben. Darüber hinaus können verschiedenartige Zytokine vom gleichen Zelltyp freigesetzt werden (TIZARD, 2004).

Im Immunsystem wirken Zytokine sowohl als Wachstumsfaktoren, als auch als Mediatoren und können hierbei stimulierend und inhibitorisch auf die Zellen des Immunsystems einwirken. Als wichtige immunstimulierende Zytokine für das zelluläre Immunsystem gelten IL-2, IL-12, IL-15, IFN- γ und GM-CSF. Andere Zytokine hingegen wie IL-4, IL-5, IL-10 und *transforming growth factor β* (TGF- β) können zwar inhibitorisch auf zytotoxische T-Zellen wirken, aber auch gleichzeitig das humorale Immunsystem aktivieren (RIBAS et al., 2000).

2.4.1. Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

GM-CSF wird im Körper hauptsächlich von T-Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet (HUBEL et al., 2002). Seine

Hauptaufgabe liegt in der Stimulierung von Produktion, Proliferation und Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen von neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, Monozyten und dendritischen Zellen (BUCHSEL et al., 2002).

Monozyten und dendritische Zellen werden von GM-CSF, aber nicht nur in Reifung und Differenzierung gefördert, sondern werden auch von ihm veranlasst, in Tumorgewebe einzuwandern, um dort die vom Tumor induzierte Unterdrückung dendritischer Zellen aufzuheben (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001). Somit ist GM-CSF essentiell für die Differenzierung und das Überleben der wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (DUNHAM & BRUCE, 2004). Darüber hinaus verstärkt GM-CSF die Funktion antigenpräsentierender Zellen durch seine Fähigkeit, die Expression von MHC-Klasse-I-Komplexen, MHC-Klasse-II-Komplexen und kostimulatorischer Moleküle hochzuregulieren (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001; TIZARD, 2004). Auch neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Makrophagen unterliegen der chemotaktischen Wirkung von GM-CSF und werden von ihm in ihrer phagozytotischen und zytotoxischen Aktivität gesteigert (TIZARD, 2004). Desweiteren vermag GM-CSF die T-Zell-vermittelte Immunantwort zu steigern (BUCHSEL et al., 2002) und unterstützt hierbei die IL-2 vermittelte T-Zellproliferation (BAXEVANIS et al., 1995). Unter dem Einfluss von GM-CSF werden auch andere Zytokine produziert, wie zum Beispiel IL-1, TNF und IL-6, die ihrerseits wieder für Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen sorgen (ARMITAGE, 1998; ARMSTRONG & HAWKINS, 2001). Auch auf die Blutversorgung von Tumor und Tumormetastasen scheint GM-CSF Einfluss zu nehmen, indem es in den Tumor infiltrierende Makrophagen zur Sekretion einer Metalloelastase anregt, welche nachfolgend als Angiostatin die Angiogenese hemmt (DONG et al., 1997).

Der antitumoröse Effekt von GM-CSF beruht somit vor allem auf der gesteigerten Zytotoxizität der peripheren mononukleären Blutzellen und der verstärkten Immunogenität der Tumorzellen durch verbesserte Antigenpräsentation (FISCHER et al., 1988).

Als Nebenwirkung bei der Verabreichung von GM-CSF als Therapeutikum werden grippeähnliche Symptome und Rötungen und Schwellungen an der Injektionsstelle beschrieben (BUCHSEL et al., 2002; RINI et al., 2003).

Desweiteren wurden vorübergehende Eosinophilien und Leukozytosen beobachtet (ARMITAGE, 1998). In hohen Dosen verabreicht wurden neben Hypoxien, Hypotensionen, Thrombosen, Perikarditiden (STERN & JONES, 1992) und dem Auftreten des Kapillar-Leck-Syndroms (EMMINGER et al., 1990; AL-HOMAIDHI et al., 1998) ab einem bestimmten Level eine Wirkungsumkehr in Form immunsuppressiver Effekte beschrieben (SERAFINI et al., 2004).

2.4.2. Weitere Zytokine

Neben GM-CSF wurden auch weitere Zytokine auf ihre immunstimulierende und antitumoröse Aktivität untersucht. Auf Studien mit IL-2 und IFN- γ wurde bereits im Kapitel Immuntherapie von Fibrosarkomen hingewiesen.

2.5. Tumor escape Mechanismen

Das Immunsystem kann zwar prinzipiell Tumorantigene erkennen und eine Immunantwort auslösen, doch sind Tumorzellen in der Lage, dieser zu entgehen (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001). Mechanismen, mit denen es Tumorzellen gelingt, von T-Zellen weder erkannt noch zerstört zu werden, werden als *tumor escape* Mechanismen bezeichnet.

So können Tumorzellen durch reduzierte oder völlig fehlende Expressierung von MHC-Klasse-I-Komplexen (COSTELLO et al., 1999) ihre Immunogenität herabsetzen und einer Erkennung durch das Immunsystem entgehen (BLATTMAN & GREENBERG, 2004). Da ein völliges Fehlen von MHC-Klasse-I-Komplexen eine Aktivierung von natürlichen Killerzellen nach sich ziehen müsste, sehen manche Forscher nur eine reduzierte Expressierung als wahren Schutz an und führen die vollkommene Abwesenheit von MHC-Klasse-I-Komplexen auf eine ungenügende Nachweisbarkeit zurück (ELMSLIE & DOW, 1997). Eine reduzierte Expressierung von MHC-Klasse-I-Komplexen findet man vor allem in metastasierten Tumorzellen, da es durch das Immunsystem zu einer Selektion negativer MHC-Klasse-I-Komplex-Klone kommt (COSTELLO et al., 1999).

Ferner wird von manchen Tumorzellen eine fehlende Expression von Kostimulations- oder Adhäsionsmolekülen als Strategie angewandt, um eine Aktivierung der T-Zellen und somit eine Antwort des Immunsystems zu verhindern (COSTELLO et al., 1999).

Ein anderer Schutz vor dem Immunsystem stellt der sogenannte *fas counterattack* dar. Hierbei machen sich Tumorzellen die Anwesenheit von Fas-Molekülen auf T-Zellen zunutze und können diese durch Stimulation mit einem von den Tumorzellen exprimierten Fas-Liganden zur Apoptose führen (O'CONNELL et al., 1999). Fas-Liganden werden häufig von Lymphom-, Melanom-, Hepatom- und Kolonkarzinomzellen exprimiert. Tumorzellen hingegen sind häufig resistent gegen einen Fas-abhängigen Apoptoseweg (COSTELLO et al., 1999).

Indolamin-2,3-Dioxygenase, ein Enzym, das ursprünglich für seine Rolle bei der maternalen Toleranz gegenüber Fetusantigenen und als Regulator der Autoimmunität bekannt war, wird von vielen Tumoren produziert und inhibiert die T-Zell Aktivierung (MULLER & PRENDERGAST, 2007).

Auch die Tarnung der Tumorantigene durch Polysaccharide (FOSS, 2002) und die anatomische Isolierung durch Kapselbildung sind weitere Mechanismen der Tumorzellen, einer Immunantwort zu entgehen (BLATTMAN & GREENBERG, 2004). Darüber hinaus gelten die Beeinflussung von regulatorischen T-Zellen und die Produktion von inhibitorischen Zytokinen, wie TGF- β oder IL-10, Stickstoffmonoxid- und Sauerstoffradikalen als zusätzliche Mechanismen, eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen zu verhindern (FOSS, 2002; ZOU, 2006; TEICHER, 2007).

3. Genterapie zur Immunstimulation

Im Jahr 1891 injizierte der US-amerikanische Arzt Dr. William Coley einem seiner Krebspatienten mehrmalig Bakterien der Art *Streptococcus pyogenes* direkt in einen Tumor und erreichte damit eine komplette Tumorremission. Coley führte daraufhin weitere klinische Versuche durch, unter anderem auch mit einer Mischung abgetöteter Bakterien, dem sogenannten Coley-Toxin, und fand die Wirksamkeit seiner Antitumortherapie bestätigt. Heute gilt Coley als Vater der Krebsimmuntherapie und die Entwicklung moderner Verfahren wie Genterapie lassen eine gezieltere Bekämpfung von Tumorzellen durch das Immunsystem zu (LEVINE, 2008).

In der Veterinär-onkologie sind erst wenige Studien zur immunologischen Genterapie publiziert. Auf die Studien von QUINTIN-COLONNA und Mitarbeitern, JOURDIER und Mitarbeitern, SIDDIQUI und Mitarbeitern und auf

die einer Kooperationsgruppe des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforschung und der Medizinischen Kleintierklinik, die sich mit der Behandlung des feline Fibrosarkoms befassen, wurde bereits im Kapitel Immuntherapie hingewiesen.

Mit der Behandlung des oralen Melanoms mittels immunologischer Gentherapie befasst sich eine Studie von DOW und Mitarbeitern aus dem Jahr 1998. Darin wurde die Wirksamkeit mehrmaliger intratumoraler Injektionen von Plasmiden, die speziesspezifisches GM-CSF oder IL-2 codieren, untersucht. 46 % der Hunde erreichten eine komplette oder partielle Remission und die mediane Überlebenszeit konnte von 15 auf 66 Wochen im Vergleich zur „historischen“ Kontrollgruppe verlängert werden (DOW et al., 1998).

4. Vektoren für den Gentransfer

Um Gene in eine Zielzelle zu schleusen bedarf es der Genfähren oder auch Genvektoren genannt. Als grobe Unterteilung werden virale von nonviralen Genvektoren unterschieden.

Als virale Vektoren kommen sowohl DNA- als auch Ribonukleinsäure (RNA)-Viren zum Einsatz. Bei erstgenannten werden vor allem Adenoviren, adenoassoziierte Viren, Pockenviren und *Herpes simplex*-Viren, bei zweitgenannten vor allem Retroviren verwendet. Die Auswahl des Virus hängt hierbei von der Charakteristik der Zielzelle ab (EL-ANEED, 2004). Durch Geneinbau und Deletion von Gensequenzen werden die Vektorviren replikationsdefekt und verlieren so ihre Pathogenität (ARGYLE, 1999; VERMA & WEITZMAN, 2005). Der große Vorteil viraler Vektoren gegenüber nonviralen liegt in ihrer hohen Effizienz, die es ihnen erlaubt, in ein breites Spektrum verschiedener Zellen einzudringen und dort die Gene direkt im Zellkern in das Genom einzubringen (GOVERDHANA et al., 2005). Die Gefahr des Auftretens replikationskompetenter Viren aufgrund von Mutationen und Rekombinationen gilt als größter Nachteil viraler Vektoren (ARGYLE, 1999).

Bei nonviralen Vektoren handelt es sich meist um Plasmide (bakterielle DNA-Moleküle), in die die gewünschte Gensequenz kloniert wird. Als Vorteile gegenüber viralen Vektoren erweisen sich die niedrige Immunogenität im Wirt und die damit verbundene geringe Toxizität, die einfache und ungefährliche

Herstellung, die keinen strengen gesetzlichen Auflagen unterliegt, die praktikablere klinische Anwendung und die Tatsache, dass sie mehrmals appliziert werden können, ohne dass neutralisierende Antikörper die Wirkung aufheben (NIIDOME & HUANG, 2002; GARDLIK et al., 2005). Als großer Nachteil gilt ihre geringe Effizienz aufgrund der mangelnden Fähigkeit, in Zielzellen eindringen zu können (NIIDOME & HUANG, 2002). Um eine gezieltere Aufnahme der Fremd-DNA in die Zielzelle zu erreichen, wurde eine Reihe von Methoden entwickelt, die im Folgenden kurz angesprochen werden:

Electroporation ist ein Verfahren, welches mit Hilfe eines elektrischen Feldes Zellmembranen für Plasmide durchgängiger macht und so den Gentransfer erleichtert (SOMIARI et al., 2000). Auch Ultraschall (HUBER & PFISTERER, 2000) und ein mit Goldpartikeln mediiertes Gentransfer, welcher als *gene gun* bezeichnet wird (SUN et al., 1995), kommen zur Effizienzsteigerung zum Einsatz. Ein weiteres Verfahren ist die Kopplung der DNA an chemische Trägermoleküle wie kationische Polymere oder Lipide (NIIDOME & HUANG, 2002), die durch ihre positive Ladung eine Interaktion mit der negativ geladenen Zellwand erleichtern und so eine endozytotische Aufnahme unterstützen (EL-ANEED, 2004).

5. Magnetofektion

Magnetofektion, ein Verfahren, das auf dem Prinzip des *magnetic drug targeting* beruht, macht sich die Anwendung superparamagnetischer Nanopartikel zunutze (PLANK et al., 2003). Hierbei werden magnetische Eisenoxidnanopartikel durch Beschichtung mit dem kationischen Polymer Polyethylenimin (PEI) stabilisiert und anschließend im Verhältnis 1:1 mit Plasmid-DNA gemischt und mit physiologischer Kochsalzlösung in Lösung gebracht. Elektrostatische Interaktionen führen zu einer Assoziation der Plasmid-DNA an die magnetischen Nanopartikel und die Kochsalzlösung induziert eine Kolloidaggregation. Der so entstandene Komplex wird als Magnetofektin bezeichnet (SCHERER et al., 2002).

Durch Ausrichtung eines Permanentmagneten (Neodymium-Eisen-Bor-Magnet) über den Zielzellen wird ein magnetisches Feld induziert, welches die Magnetofektine in die Zielzellen akkumuliert (PLANK et al., 2003). Durch das gezielte Dirigieren der Genvektoren an den gewünschten Ort wird der Gentransfer

potenziert, was eine geringere benötigte Menge an Vektoren und somit eine damit verbundene reduzierte Toxizität nach sich zieht (SCHERER et al., 2002). Abbildung 4 und 5 veranschaulichen das Prinzip der Magnetofektion.



Abbildung 4: Eisenhaltige Plasmid-DNA-Lösung

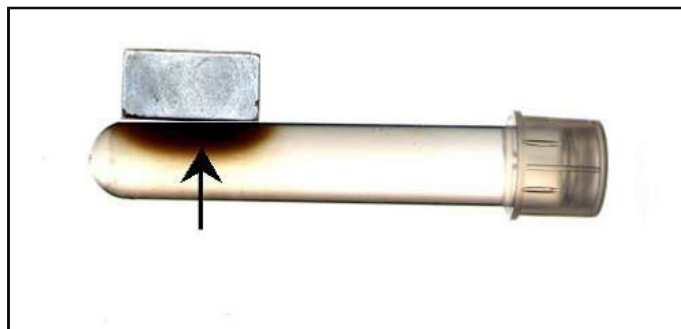


Abbildung 5: Konzentration der Plasmid-DNA-Lösung unter dem aufgelegten Neodymium-Eisen-Bor-Magneten

In einer In-vitro-Studie aus dem Jahr 2002, bei der ein magnetisches Feld über Zellkulturplatten erzeugt wurde, beobachteten SCHERER und Mitarbeiter eine schnelle Sedimentation der paramagnetischen Vektoren auf und in die Zellen und eine um mehrere hundertmal verstärkte Transfektionsrate. Ein maximales Transfektionslevel wurde hierbei in weniger als zehn Minuten erreicht. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass paramagnetische Nanopartikel alleine bereits die Transfektion steigern, die durch den Einfluss des Magnetfelds aber noch weiter verstärkt wird. Somit konnten hohe Transfektionsraten mit nur minimalen DNA-Dosen erreicht werden (SCHERER et al., 2002). HUTH und Mitarbeiter untersuchten den Aufnahmeprozess mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen und beobachteten, dass es aufgrund der Magnetofektion nur zu einer gesteigerten Sedimentation auf der Zelloberfläche, nicht aber zu einer Beeinträchtigung der Endozytose kommt

(HUTH et al., 2004). In zwei weiteren In-vitro-Studien an Endothelzellen der humanen Umbilikalvene und an Flimmerepithelzellen porcinen und humanen Ursprungs konnte eine Steigerung der Transfektionsrate um das 360-beziehungsweise 2500-fache im Vergleich zu herkömmlichen Transfektionssystemen beobachtet werden (KROTZ et al., 2003; GERSTING et al., 2004). Eine optimale Transfektionseffizienz wurde von WEI und Mitarbeitern beschrieben, wenn DNA und Nanopartikel im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Zudem beobachteten sie eine Transfektionsrate von 51 % im Vergleich zu 10 % ohne magnetisches Feld (WEI et al., 2004).

Auch In-vivo-Studien stützen die Effektivität der Magnetofektion. So verabreichten SCHERER und Mitarbeiter nonvirale Vektoren in den Magen von Mäusen, in das Ileumlumen von Ratten und in die Ohrvenen von Schweinen. Im Bereich des Magnetfelds war die Genexpression am größten, im Kontrollgewebe hingegen fand sich keine Expression (SCHERER et al., 2002). Auch bei Ratten, denen Magnetofektine in den Femoralkatheter infundiert wurden und bei denen anschließend ein Magnetfeld über dem *Musculus cremaster* erzeugt wurde, fand sich *post mortem* eine hohe Transfektionsrate im Zielzellenbereich (KROTZ et al., 2003).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Studiengrundlagen

1.1. Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelte es sich um eine prospektive klinische Phase-II-Medikamentenstudie zur Untersuchung der Wirksamkeit einer neoadjuvanten immunologischen Gentherapie bei Katzen mit Fibrosarkom. Hierbei wurde über den Zeitraum von einem Jahr eine Therapiegruppe auf die Entstehung von postoperativen lokalen Tumorrezidiven untersucht. Neben der Therapiegruppe wurde auch eine Kontrollgruppe untersucht, die sich sowohl aus aktuellen als auch aus „historischen“ Studientieren zusammensetzte. Als Hypothese lag der Studie folgende Annahme zu Grunde:

„Die immunologische Gentherapie senkt die Rezidivrate bis zum Tag 360 *post operationem*.“

Neben der Effektivität wurde auch die Toxizität des Medikaments weiter untersucht, nachdem es sich in der vorausgegangenen Phase-I-Studie in der höchsten Dosierung als gut verträglich erwiesen hatte (HUTTINGER et al., 2008). Um einen Einfluss von Erwartungen oder Verhaltensweisen seitens des Besitzers und der Tierärzte zu vermeiden, wurden diese „geblindet“ und erst nach Abschluss der Studie über die Gruppenzugehörigkeit der Tiere informiert. Es ließ sich aus technischen Gründen nicht vermeiden, dass einzelne Tierärztinnen und Tierärzte nicht „geblindet“ waren. Die wichtigen diagnostischen und therapeutischen Entscheidungen wurden aber von den „geblindeten“ Tierärztinnen und Tierärzten getroffen. Damit war eine doppelte Blindung der Studie gewährleistet.

1.2. Patientenrekrutierung

Beim Patientengut handelte es sich ausschließlich um Katzen, die als Haustiere im Privatbesitz gehalten wurden. Die Patientenrekrutierung erfolgte entweder über überweisende praktische Tierärzte, über den Internetauftritt der Studie oder über die hauseigene Onkologiesprechstunde:

Da Studien zur immunstimulatorischen Behandlung des feline Fibrosarkoms bereits seit 1999 an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München durchgeführt wurden, genossen sie bei praktischen Tierärzten, besonders im Großraum München, einen hohen Bekanntheitsgrad. Um ein kontinuierliches Patientenaufkommen zu gewährleisten, wurden diese in regelmäßigen Abständen über E-Mail mit aktuellen Informationen zu den immunstimulatorischen Studien der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München versorgt und gebeten geeignete Patienten zu überweisen (siehe Anhang 1).

Darüber hinaus wurde die Studien im Internet unter www.fibrosarkom.de vorgestellt und eine Kontaktaufnahme über Telefon oder E-Mail angeboten.

Eine dritte Quelle für die Rekrutierung von Patienten stellte die hauseigene Onkologiesprechstunde der Medizinischen Kleintierklinik München dar.

Da der erste Kontakt meist telefonisch erfolgte, wurden die Patientenbesitzer bereits auf diesem Weg über den Ablauf und die Ziele der Studie informiert. Außerdem wurden erste anamnestische Erhebungen gemacht, um schon vorab eventuelle Ausschlusskriterien abzuklären.

Im Rahmen der ersten klinischen Vorstellung erfolgte ein ausführliches persönliches Gespräch, in dem allgemeine Fragen zum feline Fibrosarkom und der Ablauf und die Ziele der Studie genau erörtert wurden. Zusätzlich wurden die Patientenbesitzer über mögliche Nebenwirkungen der Behandlung und das Narkoserisiko im Zusammenhang mit der Operation aufgeklärt. Auch die Kosten, die im Rahmen der Studie anfielen und die komplett vom Forschungsprojekt getragen wurden, wenn ein zuverlässiges Wiedervorstellen der Patienten zu fest definierten Kontrollterminen gewährleistet war, wurden hierbei angesprochen. Im Anschluss daran erhielten die Patientenbesitzer ein Informationsblatt, in dem alle wichtigen Informationen zum feline Fibrosarkom und zur Studie zusammengestellt waren (siehe Anhang 2). Nach dem schriftlichen Einverständnis zur Studienteilnahme (siehe Anhang 3) erfolgte schließlich die Erstuntersuchung, die über die endgültige Aufnahme des Patienten in die Studie entschied.

1.3. Einschlusskriterien

Zur Teilnahme an der Studie waren Katzen zugelassen, die sowohl an einem Primärtumor, als auch an einem Rezidiv des feline Fibrosarkoms litten. Hierbei musste der Tumor am Rumpf lokalisiert und in einer operativen Sitzung

exstirpierbar sein. Ferner musste der Patient, abgesehen von der Tumorerkrankung, eine geschätzte Lebenserwartung von mehr als einem Jahr haben. Alter, Rasse und Geschlecht hingegen stellten keine für die Aufnahme in die Studie relevanten Kriterien dar.

1.4. Ausschlusskriterien

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten, deren Operation eine Amputation einer Gliedmaße nötig machte. Auch Tiere, die bereits mit einer Chemo-, Strahlen- oder Gentherapie behandelt worden waren oder in den letzten sechs Wochen vor Erstvorstellung Immunsuppressiva erhalten hatten, wurden von der Studienteilnahme ausgeschlossen. Desweiteren durften die Patienten vorberichtlich an keiner anderen Tumorerkrankung gelitten haben. Auch das Vorliegen von Metastasen bei Erstvorstellung führte zum Studienausschluss. Zusätzlich konnten trächtige Tiere und Tiere, die positiv auf das Feline Leukämievirus (FeLV) oder das Feline Immundefizienz-Virus (FIV) getestet wurden, nicht an der Studie teilnehmen. Da der Ablauf mehrere Kontrolluntersuchungen nötig machte, wurden auch Katzen mit hochgradiger Aggressivität, deren Untersuchung eine Sedation erforderte, nicht in die Studie aufgenommen.

2. Studienablauf

2.1. Aufnahmeuntersuchung

Die Anamnese beinhaltete neben der Befragung nach der aktuellen Krankengeschichte auch die Erhebung der Impfhistorie.

Bei der nun folgenden klinischen Allgemeinuntersuchung wurden folgende Untersuchungsparameter beurteilt oder gemessen: Allgemeinbefinden, Verhalten, Körpertemperatur, Gewicht, Ernährungszustand, Pflegezustand, Schleimhautfarbe, kapilläre Füllungszeit, Hautturgor, Herzfrequenz, Herzauskultation, Atemfrequenz, Lungenauskultation, Abdomenpalpation, Palpation der mandibulären und poplitealen Lymphknoten und Schilddrüsenpalpation.

Dann wurde der Tumor mit Hilfe einer Schieblehre in drei Dimensionen (D1, D2, D3) vermessen und seine Lokalisation, Anzahl und palpatorische Beschaffenheit beurteilt. Palpatorische Beurteilungskriterien hierbei waren Konsistenz,

Oberflächenbeschaffenheit und die Abgrenzbarkeit und Verschieblichkeit gegenüber dem umliegenden Gewebe. Die Vermessung in drei Dimensionen diente der Einteilung in das Tumorstaging nach HIRSCHBERGER und KESSLER (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001) und in die Klassen großer Tumor und kleiner Tumor. Zusätzlich wurden große und kleine Tumoren in Primärtumoren und Tumorrezidive eingeteilt. Einen Überblick über das Tumorstaging und die Einteilung in die Tumorklassen geben Tabelle 1 und 2.

Tabelle 1: Tumorstaging nach HIRSCHBERGER und KESSLER

Stadium	Tumorgröße ((D1+D2+D3)/3)	Anzahl der Tumoren	Metastasen der regionären Lymphknoten	Fernmetastasen
I	<2 cm	1	N0	M0
II	2-3 cm	1	N0	M0
III	>3 cm oder	>1	N0	M0
IV	jede Größe	jede Anzahl	N1 oder	M1

N0: keine Metastasen der Lymphknoten; N1: Metastasen der Lymphknoten vorhanden; M0: keine Fernmetastasen; M1: Fernmetastasen vorhanden;

Tabelle 2: Einteilung der Tumoren in Klassen

	Primärtumor	Tumorrezidiv
1 Tumorabmessung ≤ 2 cm	kleiner Primärtumor	kleines Tumorrezidiv
1 Tumorabmessung >2 cm	großer Primärtumor	großes Tumorrezidiv

Abschließend zur speziellen Tumoruntersuchung wurden mehrere Feinnadelaspirationszytologieproben aus dem Tumor entnommen und mikroskopisch beurteilt. Die Fixation und Färbung der Präparate erfolgte hierbei nach der modifizierten Wright-Färbung im Hematec® (Bayer Animal Health Care; Leverkusen; Deutschland).

Bei der nun folgenden bildgebenden Diagnostik wurde erst der Thorax anhand von Röntgenaufnahmen in drei Ebenen (links l/l, rechts l/l, v/d), dann das Abdomen mittels Sonographie untersucht. Bei der Beurteilung wurde neben dem Vorhandensein von Metastasen besonders auf das Bestehen möglicher anderer Grunderkrankungen geachtet.

Als letzter Punkt der Aufnahmeuntersuchung wurden Blutuntersuchungen durchgeführt, deren Proben mit Hilfe einer Kanüle (BD Microlance™; Becton Dickinson; Madrid; Spanien) entweder aus der *Vena cephalica antebrachii* oder aus der *Vena saphena* gewonnen wurden. Als Probenröhrchen dienten zum einen zwei 2-ml-Kalium-Ethylendiamintetraacetat (2-ml-Ka-EDTA) Röhrchen (Sarstedt; Nümbrecht; Deutschland), zum anderen ein 5-ml-Serumröhrchen (Sarstedt; Nümbrecht; Deutschland). Im Labor der Medizinischen Kleintierklinik wurden aus dem Vollblut mit Hilfe eines vollautomatischen Hämatologiegeräts (Cell-Dyn® 3500 R; Abbott Laboratories; Chicago, Illinois; USA) folgende Parameter bestimmt: Erythrozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobingehalt, mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), mittleres Erythrozyteneinzelvolumen (MCV), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), Thrombozyten- und Gesamtleukozytenzahl. Das Differentialblutbild mit Anzahl der neutrophilen (stab- und segmentkernige), eosinophilen sowie basophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wurde an einem Blutaussstrich mikroskopisch ermittelt.

Ebenfalls im Labor der Medizinischen Kleintierklinik wurden aus dem Serum mit Hilfe eines automatischen Blutchemieanalysators (Automatic Analyzer Hitachi® 911; Roche Diagnostics; Indianapolis, Indiana; USA) nachstehende Blutparameter ermittelt: Aspartat-Amino-Transferase (AST), Alkalische Phosphatase (AP), Harnstoff, Kreatinin, Totalprotein, Albumin, Natrium, Kalium, Calcium, Phosphat, Chlor, Gesamtbilirubin, Glucose und Thyroxin (T4). Ferner wurden aus dem Serum ein FIV-Antikörpertest und ein FeLV-Antigentest durchgeführt. Vollblut, das nach Bestimmung der oben aufgeführten Werte übrig blieb, wurde zentrifugiert (5 min bei 4000 U/min) und das so gewonnene Plasma in ein 2-ml-Eppendorf-Gefäß (Sarstedt; Nümbrecht; Deutschland) abpipetiert und bei - 70°C für weitere Untersuchungen asserviert. Ebenso wurde mit dem verbliebenen Serum verfahren.

Alle Daten, die in der Aufnahmeuntersuchung erhoben wurden, wurden sorgfältig auf einem vorgefertigten Formblatt (siehe Anhang 4) notiert und zusammen mit den Laborbefunden, Kopien vom Impfpass und möglichen histopathologischen Befunden der Krankenvorgeschichte aufbewahrt.

Anschließend erfolgte die Beurteilung der Befunde der Aufnahmeuntersuchung anhand der Ein- und Ausschlusskriterien. Waren alle Kriterien erfüllt, wurde die

Katze in die Studie aufgenommen und es folgte eine Verteilung in die Therapie- oder in die Kontrollgruppe.

2.2. Zeitplan

Die Behandlung mit der immunologischen Gentherapie erfolgte ambulant zweimalig *prae operationem*, wobei die erste Applikation zwei Wochen, die zweite Applikation eine Woche vor der Tumorexstirpation erfolgte. Der Operationstag wurde als d1 bezeichnet.

Bei Tieren der Therapiegruppe schloss sich die erste Behandlung direkt an die Erstuntersuchung an und erfolgte somit noch am selben Tag zwei Wochen vor der Operation, also am d-14. Folgerichtig wurde der Tag der zweiten Medikamentenapplikation als d-7 definiert. An d0 erfolgte die stationäre Aufnahme der Studientiere für die am folgenden Tag stattfindende Operation.

Da die Tiere der Kontrollgruppe weder ein anderes Medikament noch ein Placebo erhielten, wurde bei ihnen aus ethischen Gründen auf eine Vorlaufzeit von zwei Wochen, in der der Tumor hätte weiter wachsen können, verzichtet und somit der Tag der Aufnahmeuntersuchung als d0 definiert. Eine Operation erfolgte bei diesen Tieren am darauffolgenden Tag.

Im Regelfall einer komplikationslosen Operation und postoperativen Phase wurden die Patienten der Therapiegruppe und der Kontrollgruppe an d2 nach Hause entlassen. Ambulante Kontrolluntersuchungen fanden für beide Gruppen an d14, d45, d90, d180 und d270 statt. An d360 wurde die Abschlussuntersuchung durchgeführt. Wurden im Laufe des Beobachtungsjahres ein Tumorrezidiv oder Tumormetastasen festgestellt, war für die betroffenen Katzen die Studie vorzeitig beendet. Tabelle 1 gibt einen Überblick über den Zeitplan für die Therapie- und Kontrollgruppe.

Tabelle 3: Zeitplan für Therapie- und Kontrollgruppe

Tag	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
d-14	Aufnahmeuntersuchung (inkl. Blutbild, Blutchemie, Röntgen, Ultraschall), 1. intratumorale Injektion, Magnetofektion	
d-7	Klinische Untersuchung (inkl. Blutbild, Blutchemie), 2. intratumorale Injektion, Magnetofektion	
d0	Präoperative Untersuchung (inkl. Blutbild, Blutchemie)	Aufnahmeuntersuchung (inkl. Blutbild, Blutchemie, Röntgen, Ultraschall)
d1	Operation	Operation
d2	Postoperative Untersuchung (inkl. Blutbild)	Postoperative Untersuchung (inkl. Blutbild)
d14	Klinische Untersuchung (inkl. Blutbild, Blutchemie), Fädenziehen	Klinische Untersuchung (inkl. Blutbild, Blutchemie), Fädenziehen
d45, d90, d180, d270	Klinische Untersuchung (inkl. Blutbild, Blutchemie)	Klinische Untersuchung (inkl. Blutbild, Blutchemie)
d360	Abschlussuntersuchung (inkl. Blutbild, Blutchemie, Röntgen, Ultraschall)	Abschlussuntersuchung (inkl. Blutbild, Blutchemie, Röntgen, Ultraschall)

d: Tag;

2.3. Herstellung der Injektionslösung

In einer vorausgegangenen Studie sind Gene, die für feGM-CSF kodieren, aus peripheren mononukleären Blutzellen isoliert und mit Hilfe des Zytomegalieviruspromoters in ein Expressionsplasmid kloniert worden, welches als Ursprungsplasmid für die Plasmidproduktion fungierte (SCHWARZ et al., 2007).

Die Herstellung der Plasmide erfolgte durch die Plasmid Factory GmbH & Co. KG (Bielefeld; Deutschland) in einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration von 5,0 mg Plasmiden auf 1 ml Wasser. Die Chemicell GmbH (Berlin; Deutschland) stellte die für die Studie benötigten magnetischen Eisenoxid-Nanopartikel her, welche mit dem Polykation Polyethylenimin (PEI) behüllt in einer wässrigen Lösung in der Konzentration von 60 mg Nanomaterial auf 1 ml Wasser produziert wurden.

Zur finalen Herstellung der Injektionslösung unmittelbar vor der Injektion wurden Plasmid- und Nanopartikellösung im Verhältnis 1:1 gemischt, wobei eine Bindung aufgrund elektrostatischer Anziehungskräfte zwischen der negativ geladenen Plasmid-DNA und der positiv geladenen PEI-Hülle erfolgte (SCHERER et al., 2002).

2.4. Intratumorale Injektion und Magnetofektion

An d-14 und d-7 erfolgte die intratumorale Injektion von je 500 µl der Injektionslösung, was der von HÜTTINGER und Mitarbeitern ermittelten MTD von 1250 µg GM-CSF je Anwendung entsprach (HUTTINGER et al., 2008). Anschließend an jede Injektion wurde ein Neodymium-Eisen-Bor-Magnet (Neo Delta Magnet NE2010; IBS Magnet; Berlin; Deutschland) für den Zeitraum von einer Stunde mit einem Klebeband direkt auf dem Tumor befestigt, um damit das für die Magnetofektion benötigte Magnetfeld zu erzeugen. Bis zur Entfernung des Magneten nach einer Stunde standen die Katzen unter ständiger Beobachtung um mögliche Nebenwirkungen zu dokumentieren und ihnen gegebenenfalls entgegenzuwirken. Abbildung 6 und 7 zeigen die Fixation des Neodymium-Eisen-Bor-Magneten auf einem Klebeband beziehungsweise auf einer Therapiekatze.

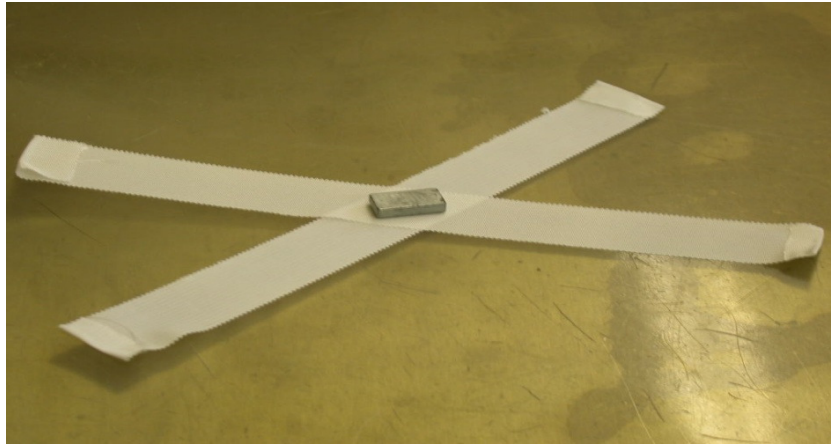


Abbildung 6: Neodymium-Eisen-Bor-Magnet auf Klebeband (Aus dem Foto-Archiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)



Abbildung 7: Neodymium-Eisen-Bor-Magnet auf dem Tumor einer Therapiekatze (Aus dem Foto-Archiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)

Auch an d-7 fand vor der Injektion eine komplette klinische Untersuchung mit Tumorvermessung und Erstellung eines Blutbildes und eines Serumprofils statt, um mögliche Veränderungen, welche nach der ersten Applikation hätten auftreten können, zu kontrollieren und um so die Sicherheit für die zweite intratumorale Injektion zu erhöhen. Auch diese Untersuchung wurde anhand eines Formblatts dokumentiert und zusammen mit den Ergebnissen der Blutuntersuchung aufbewahrt (siehe Anhang 5).

2.5. Operation und postoperative Phase

An d0 wurden die Katzen der Therapiegruppe für die am nächsten Tag stattfindende Operation stationär aufgenommen und klinisch untersucht. Auch an diesem Tag wurde eine genaue Vermessung des Tumors durchgeführt und ein Blutbild und ein Serumprofil angefertigt.

Da für die Kontrolltiere die Operation am Tag nach der Aufnahmeuntersuchung stattfand, wurden sie direkt im Anschluss an diese stationär aufgenommen.

Für den stationären Aufenthalt wurden alle Katzen mit einem Venenverweilkatheter (Vasofix®; B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland) entweder in die *Vena cephalica antebrachii* oder in die *Vena saphena* versehen.

Die Operation an d1 fand in der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der LMU München statt, wobei alle Katzen vom selben Chirurgen- und Anästhesistenteam betreut wurden. Sowohl das Chirurgen- als auch das Anästhesistenteam waren in Bezug auf die Gruppenzugehörigkeit der Katzen „geblindet“.

Alle Katzen erhielten dasselbe Anästhesieprotokoll, wobei zur Prämedikation 0,2 mg/kg KG Midazolam (Dormicum®; Roche; Grenzach-Wyhlen; Deutschland) und zur Narkoseinleitung 4,0 mg/kg KG Propofol (Rapinovel®; Essex Pharma; München; Deutschland) intravenös verabreicht wurden. Die Erhaltung der Anästhesie erfolgte inhalatorisch mit einem Luftgemisch aus Isofluran (Isoba®; Essex Pharma; München; Deutschland) und Sauerstoff.

Bei der Operation wurde der Tumor mit einem Sicherheitsabstand von drei Zentimetern zur Seite und einer gesunden Gewebeschicht zur Tiefe hin *en-bloc* reseziert und die Wunde in drei Schichten verschlossen. Der exstirpierte Tumor wurde anschließend für die histopathologische Untersuchung an seinem cranialen Ende mit einem Faden markiert und in Formalin eingelegt. Abbildung 8 und 9 zeigen eine Katze vor beziehungsweise nach der Operation.



Abbildung 8: Katze mit Fibrosarkom cranial der Schulterblätter vor der Operation (Aus dem Foto-Archiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)



Abbildung 9: Katze nach Tumorexstirpation (Aus dem Foto-Archiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)

Zur Analgesie erhielten die Katzen einmalig vor der Operation und dann dreimalig alle 8 Stunden Buprenorphin (Temgesic®: Essex Pharma; München; Deutschland) intravenös in der Dosierung von 0,01 mg/kg KG. Peri- und postoperativ wurde den Katzen insgesamt 250 ml Ringer-Lactat-Lösung (B. Braun Melsungen AG; Meldungen; Deutschland) in einer Dosierung von 3,5 ml/kg KG/h als Dauertropfinfusion intravenös verabreicht. Die antibiotische Behandlung beinhaltete zweimal täglich eine intravenöse Injektion von 12,5 mg/kg KG Amoxicillin-Clavulansäure (Augmentan®; GlaxoSmithKline;

München; Deutschland) ab d1.

Die Heimgabe erfolgte in der Regel an d2, wenn nach der klinischen Untersuchung und nach Anfertigung eines Blutbilds keine ernsthaften Abnormalitäten erkennbar waren. Zu Hause erhielten die Patienten weiterhin Amoxicillin-Clavulansäure, das oral (Synulox ®; Pfizer; Karlsruhe; Deutschland) in derselben Dosierung wie als Injektionslösung bis zum Tag 6 vom Besitzer verabreicht wurde. Analgetisch erhielten die Katzen nach Heimgabe einmal täglich Meloxicam (Metacam ®; Boehringer Ingelheim; Ingelheim; Deutschland) oral, wobei mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG am ersten Tag nach Heimgabe begonnen wurde, welche dann für die drei Folgetage auf 0,1 mg/kg KG reduziert wurde.

2.6. Zytologische und histopathologische Untersuchung

Nach erfolgter Tumorexstirpation wurden aus der Tumormitte Abkratzpräparate angefertigt und nach einer modifizierten Wright-Färbung zytologisch beurteilt. Zur histopathologischen Untersuchung wurde der in Formalin eingelegte Tumor an das Institut für Tierpathologie der LMU München gesandt. Katzen, deren Tumor nach der histopathologischen Untersuchung nicht als Fibrosarkom eingestuft wurde, wurden im Nachhinein aus der Studie ausgeschlossen. Darüberhinaus wurden die diagnostizierten Fibrosarkome anhand der Untersuchungskriterien von COUTO und Mitarbeitern histologisch in Grade eingeteilt (COUTO et al., 2002). Kriterien hierbei waren die zelluläre Morphologie, die Anwesenheit von Nekrose und ihre Ausmaße und die Mitoserate.

2.7. Kontrolluntersuchungen

Die nachfolgenden Kontrolluntersuchungen fanden an fest definierten Tagen statt (d14, d45, d90, d180, d270) und wurden ambulant durchgeführt. An d14 erfolgte die Entfernung der Operationsfäden. Jede Kontrolluntersuchung beinhaltete eine Anamnese, eine klinische Untersuchung und das Anfertigen eines Blutbildes und eines Serumprofils. Darüberhinaus wurden die Katzen palpatorisch auf mögliche Tumorrezidive untersucht. Im Falle eines Rezidivverdachts, wurden Feinnadelaspirationszytologieproben entnommen und daraufhin zytologisch beurteilt. Im Fall eines Rezidivs war für die betroffene Katze die Studie beendet. Darüberhinaus wurden die Besitzer dazu angehalten, einen möglichen

Rezidivverdacht oder mögliche Nebenwirkungen sofort zu melden, so dass auch Untersuchungen zwischen den fest definierten Kontrolluntersuchungsterminen vereinbart werden konnten.

2.8. Abschlussuntersuchung

An d360, also ein Jahr nach der Operation, fand die Abschlussuntersuchung statt. Wie bei den Kontrolluntersuchungen zwischen d14 und d270 wurden der klinische Zustand, das Auftreten möglicher Rezidive und das Blut untersucht. Ferner wurden wie bei der Aufnahmeuntersuchung Röntgenaufnahmen des Thorax und Ultraschallaufnahmen des Abdomens angefertigt, um das Vorhandensein von Metastasen beurteilen zu können.

Die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen und der Abschlussuntersuchung wurden wie bei den vorangegangenen Untersuchungen in speziellen Formblättern dokumentiert und zusammen mit den Laborbefunden archiviert (siehe Anhang 6 und 7).

3. Studienauswertung

3.1. Auswahl der Kontrollgruppe

Um die Aussagekraft der Studie im Hinblick auf die Wirksamkeit und das Auftreten von Nebenwirkungen zu erhöhen, wurde die Kontrollgruppe mit Hilfe einer Blockrandomisierung nach dem Parameter Tumorklasse ausgewählt. Hierfür wurden aus dem Pool der „historischen“ und aktuellen Kontrolltiere die chronologisch letzten Katzen sortiert, welche genau der Eigenschaft der Therapiegruppe bezüglich Tumorklasse entsprachen. So wurde erreicht, dass in der Kontrollgruppe ebensoviele Katzen wie in der Therapiegruppe mit einem kleinen beziehungsweise großen Primärtumor und mit einem kleinen beziehungsweise großen Tumorrezidiv vertreten waren.

3.2. Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe

Zusätzlich wurde die Ähnlichkeit der Gruppen in Bezug auf das Alter, das Gewicht, das Geschlecht, die Tumorlokalisation und die Verteilung in das Tumorstaging statistisch geprüft.

Alter und Gewicht wurden zunächst bei der Gesamtheit der Tiere auf Normalverteilung anhand des Kolmogorow-Smirnow-Tests untersucht.

Anschließend wurde der t-Test bei unabhängigen Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte angewendet.

Die Ähnlichkeit der beiden Gruppen bezüglich Geschlecht, Tumorlokalisation und der Verteilung in das Tumorstaging hingegen wurde anhand des Chi-Quadrat-Tests überprüft.

Für alle Tests wurde ein p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant definiert. Zur Berechnung diente statistische Software der Firma SPSS (SPSS® Version 18; SPSS Incorporation; Chicago, Illinois; USA).

3.3. Beurteilung von Nebenwirkungen

Die Beurteilung möglicher Nebenwirkungen erfolgte anhand der *common terminology criteria for adverse events* (CTCAE) der *veterinary co-operative oncology group* (VCOG, 2004). Hierbei handelt es sich um eine Tabelle, die bei der Erprobung neuer Medikamente für onkologische Tierpatienten (Hunde und Katzen) anhand verschiedener Untersuchungsparameter mögliche Nebenwirkungen formuliert und die Schwere der Nebenwirkungen in bestimmte Grade einteilt. Die Einteilung erfolgt in Grad 1 bis Grad 5, wobei Grad 1 eine milde, Grad 5 eine schwerwiegende Nebenwirkung oder den Tod des Tieres beschreibt. Beurteilungsparameter, die nicht in der Tabelle vorlagen, wurden selbst definiert. Tabelle 4 zeigt die Untersuchungsparameter und ihre Einteilung in Grade nach der CTCAE-Tabelle. Tabelle 5 zeigt die Untersuchungsparameter, die nicht in der Tabelle auftauchen und deshalb selbst definiert wurden.

Tabelle 4: Nebenwirkungen nach CTCAE-Tabelle

Nebenwirkung	Beschreibung	Grad
Allergische Reaktion	vorrübergehende Urtikaria	1
	Ausschlag; Urtikaria; Dyspnoe	2
	symptomatische Hypotension, mit oder ohne Urtikaria; parenterale Medikamente notwendig; Ödem	3
	Anaphylaxie, die parenterale Medikamente notwendig macht	4
	Tod	5

Gewichtsverlust	5-10 % vom Ausgangswert; Intervention nicht angezeigt	1
	>10-20 % vom Ausgangswert; Ernährungsunterstützung angezeigt	2
	>20 % vom Ausgangswert	3
	-	4
	Tod	5
Lethargie/Erschöpfung	milde Lethargie	1
	moderate Lethargie, welche Schwierigkeiten bei der Lebensaktivität bereitet	2
	gefährdet; schwere Einschränkung bei Lebensaktivität; ambulatorische Behandlung notwendig bis Wiederaufnahme der Lebensaktivität	3
	schwerbeschädigt; Zwangsfütterung und Unterstützung bei Lebensaktivität notwendig	4
	Tod	5
Hyperthermie	>39,0-40,0 °C	1
	>40,0-41,0 °C	2
	>41,0-42,0 °C	3
	>42,0 °C	4
	Tod	5
Anorexie	Überredung oder Ernährungswechsel notwendig um Appetit aufrechtzuerhalten	1
	veränderte Nahrungsaufnahme (<3 Tage) ohne signifikanten Gewichtsverlust; orale Ernährungsunterstützung angezeigt	2
	Dauer von 3-5 Tagen; assoziiert mit Gewichtsverlust oder Malnutrition; intravenöse Flüssigkeiten, Sondenfütterung oder totale parenterale Ernährung angezeigt	3
	lebensbedrohlich; Dauer von >5 Tagen	4
	Tod	5

Vomitus	<3 Episoden in 24 Stunden	1
	3-5 Episoden in 24 Stunden; <3 Episoden/Tag für >2 Tage aber <5 Tage; parenterale Flüssigkeiten notwendig für <24 Stunden	2
	>5 Episoden in 24 Stunden; Erbrechen >4 Tage; parenterale Flüssigkeiten oder Ernährung angezeigt für >24 Stunden	3
	lebensbedrohlich (z.B. hämodynamischer Kollaps)	4
	Tod	5
Diarrhoe	Erhöhung vom Ausgangswert um >2 Stühle pro Tag	1
	Erhöhung vom Ausgangswert um 2-6 Stühle pro Tag; parenterale Flüssigkeiten angezeigt für <24 Stunden; keine Beeinträchtigung der Lebensaktivität	2
	Erhöhung vom Ausgangswert um >6 Stühle pro Tag; Inkontinenz; intravenöse Flüssigkeiten >24 Stunden notwendig; Hospitalisation; Einschränkung der Lebensaktivität	3
	lebensbedrohlich (z.B. hämodynamischer Kollaps)	4
	Tod	5
Konstipation	gelegentliche oder intermittierende Symptome; gelegentliche Anwendung von Stuhl-Weichmachern, Laxantien, Ernährungsumstellung oder Klistieren	1
	persistierende Symptome mit regelmäßiger Anwendung von Laxantien oder Klistieren	2
	Symptome beeinträchtigen Lebensaktivität; manuelle Entleerung angezeigt	3
	lebensbedrohlich (z.B. Obstruktion, Megakolon)	4
	Tod	5
Hämoglobin ↓	<9,0-8,0 g/dl	1
	<8,0-6,5 g/dl	2
	<6,5-5,0 g/dl	3
	<5,0 g/dl	4
	-	5

Hämatokrit ↓	25-<30 %	1
	20-<25 %	2
	15-<20 %	3
	<15 %	4
	-	5
Thrombozyten ↓	100.000-<180.000/μl	1
	50.000-99.000/μl	2
	25.000-49.000/μl	3
	<25.000/μl	4
	-	5
segmentkernige neutrophile Granulozyten ↓	1.500-<3.000/μl	1
	1.000-1.499/μl	2
	500-999/μl	3
	<500/μl	4
	-	5
AST ↑	>63-94,5 U/l	1
	>94,5-126 U/l	2
	>126-630 U/l	3
	>630 U/l	4
	-	5
Bilirubin ↑	>4,74-7,11 μmol/l	1
	>7,11-14,22 μmol/l	2
	>14,22-47,4 μmol/l	3
	>47,4 μmol/l	4
	-	5
Albumin ↓	<2,6-2,0 g/dl	1
	<2,0-1,5 g/dl	2
	<1,5 g/dl	3
	-	4
	-	5
Kreatinin ↑	>169-253,5 μmol/l	1
	>253,5-338 μmol/l	2
	>338-507 μmol/l	3
	>507 μmol/l	4
	Tod	5
Glucose ↑	>124-200 mg/dl	1
	>200-250 mg/dl	2
	>250-500 mg/dl	3
	>500 mg/dl	4
	Tod	5

Tabelle 5: Nebenwirkungen nach selbst definierter Tabelle

Nebenwirkung	Beschreibung	Grad
Wundheilungsstörung	Gewebsentzündung (unspezifische Entzündungszeichen)	1
	oberflächliche Infektion	2
	starke Infektion; Antibiotika erforderlich	3
	in die Tiefe reichende Wundinfektion	4
	-	5
Thrombozyten ↑	>550.000-1.000.000/ μ l	1
	>1.000.000/ μ l	2
	-	3
	-	4
	-	5
Leukozyten ↑	>15.000-20.000/ μ l	1
	>20.000-25.000/ μ l	2
	>25.000-30.000/ μ l	3
	>30.000/ μ l	4
	-	5
Leukozyten ↓	4.500-<6.000/ μ l	1
	2.000-<4.500/ μ l	2
	500-<2.000/ μ l	3
	<500/ μ l	4
	-	5
Monozyten ↑	>500-1.000/ μ l	1
	>1.000-2.000/ μ l	2
	>2.000/ μ l	3
	-	4
	-	5
Lymphozyten ↑	>4.000-10.000/ μ l	1
	>10.000/ μ l	2
	-	3
	-	4
	-	5
Lymphozyten ↓	800-<1.000/ μ l	1
	500-<800/ μ l	2
	<500/ μ l	3
	-	4
	-	5

stabkernige neutrophile Granulozyten ↑	>600-3.000/ μ l	1
	>3.000/ μ l	2
	-	3
	-	4
	-	5
eosinophile Granulozyten ↑	>600-3.000/ μ l	1
	>3.000/ μ l	2
	-	3
	-	4
	-	5
basophile Granulozyten ↑	>40-100/ μ l	1
	>100/ μ l	2
	-	3
	-	4
	-	5

Für die statistische Auswertung der Nebenwirkungen wurden innerhalb der Therapiegruppe für jeden einzelnen Untersuchungsparameter die Grade von d-14 mit denen von d-7, d0, d14 und d45 mit Hilfe des Wilcoxon-Tests verglichen.

Zusätzlich wurden für jeden einzelnen Untersuchungsparameter die Grade von d-14 der Therapiegruppe mit denen von d0 der Kontrollgruppe, die von d14 der Therapiegruppe mit denen von d14 der Kontrollgruppe und die von d45 der Therapiegruppe mit denen von d45 der Kontrollgruppe verglichen. Als statistischer Test diente hierbei der Mann-Whitney-Test.

Für alle Tests wurde ein p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant definiert. Zur Berechnung diente statistische Software der Firma SPSS (SPSS® Version 18; SPSS Incorporation; Chicago, Illinois; USA).

3.4. Statistische Auswertung der Effektivität

Zur statistischen Auswertung der Effektivität der Therapie wurde eine Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche anhand des Log-Rang-Tests durchgeführt. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich für beide Gruppen von d1 bis d360. Hierbei wurde als zu untersuchendes Ereignis das Auftreten eines Tumorrezidivs, als zensiertes Ereignis das Auftreten von Lungenmetastasen definiert. Anschließend wurde eine Kaplan-Meier Kurve angefertigt.

Ein p-Wert von $<0,05$ wurde hierbei als statistisch signifikant definiert. Die Berechnung und das Anfertigen der Kaplan-Meier Funktion erfolgte mit statistischer Software der Firma SPSS (SPSS® Version 18; SPSS Incorporation; Chicago, Illinois; USA).

IV. ERGEBNISSE

1. Patientengut

Das Patientengut umfasste 34 Katzen für die Therapiegruppe und 34 Katzen für die Kontrollgruppe, die sich sowohl aus aktuellen als auch „historischen“ Patienten zusammensetzte.

1.1. Therapiegruppe

Zwischen dem 17.01.2006 und dem 11.07.2007 wurden 34 Katzen mit Fibrosarkom in die Studie aufgenommen, die mit dem feline Zytokin-Gen GM-CSF mittels Magnetofektion in der Medizinischen Kleintierklinik der LMU behandelt wurden. Die Aufteilung auf das Geschlecht war gleichmäßig und alle Katzen waren kastriert. Das Alter der Tiere bei der Aufnahmeuntersuchung lag zwischen drei und 16 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 8,5 Jahren. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere betrug bei der Aufnahmeuntersuchung 4,95 Kilogramm. Am häufigsten war der Tumor an den klassischen Impfstellen zu finden. So war er bei 14 Katzen zwischen den Schulterblättern, bei 13 Katzen an der lateralen Brustwand, bei drei Katzen caudal der Schulterblätter und bei einer Katze auf dem Schulterblatt lokalisiert. Bei zwei Katzen war der Tumor an der Bauchwand zu finden, bei einer Katze in der Halsregion. Nach dem Tumorstaging wurden elf Katzen in Stadium I, zwölf Katzen in Stadium II und elf Katzen in Stadium III eingeteilt. 22 Katzen litten an einem Primärtumor, von denen sechs Tumoren als klein und 16 Tumoren als groß eingestuft wurden. Die übrigen zwölf Tumorrezidive verteilten sich auf fünf kleine und sieben große Tumoren. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Therapiegruppe.

Tabelle 6: Therapiegruppe

Therapiekatze Nr.	laufende FSA Nr.	Geschlecht	Alter	Gewicht	Tumorlokalisation	Tumorstaging	Tumorklasse
1	374	wk	16 J	5,00 kg	caudal der <i>Scapulae</i>	I	PG
2	377	mk	12 J	5,45 kg	Brustwand	III	PG
3	382	wk	10 J	6,93 kg	Brustwand	I	PK
4	387	mk	11 J	6,70 kg	interscapulär	III	PG
5	389	wk	12 J	3,80 kg	Brustwand	III	RK
6	390	mk	8 J	5,40 kg	auf der <i>Scapula</i>	I	RK
7	421	wk	6 J	4,96 kg	caudal der <i>Scapulae</i>	II	PG
8	422	mk	8 J	4,02 kg	Brustwand	I	PK
9	424	wk	7 J	3,79 kg	Brustwand	I	RG
10	425	wk	7 J	2,86 kg	Brustwand	II	PG
11	427	wk	9 J	3,30 kg	Brustwand	I	RG
12	428	wk	13 J	5,02 kg	Brustwand	I	RK
13	430	mk	6 J	4,93 kg	interscapulär	III	PG
14	432	mk	9 J	4,20 kg	interscapulär	II	RG
15	445	wk	8 J	5,10 kg	interscapulär	III	PG
16	449	wk	7 J	6,36 kg	interscapulär	II	RG
17	455	mk	12 J	3,34 kg	Hals	I	PK
18	456	mk	14 J	5,31 kg	Brustwand	I	PK
19	463	wk	7 J	5,30 kg	caudal der <i>Scapulae</i>	III	PG
20	467	wk	12 J	4,71 kg	interscapulär	II	PG
21	469	wk	6 J	4,14 kg	Brustwand	III	PG
22	473	mk	12 J	6,00 kg	interscapulär	I	PK
23	476	mk	8 J	10,27 kg	interscapulär	II	RG
24	478	wk	10 J	4,30 kg	interscapulär	III	RK
25	479	mk	4 J	6,00 kg	Bauchwand	II	PG
26	482	wk	4 J	2,60 kg	interscapulär	III	PG
27	487	mk	5 J	4,50 kg	Bauchwand	II	PG
28	491	mk	6 J	6,35 kg	interscapulär	II	PG
29	492	mk	6 J	5,05 kg	interscapulär	II	RG
30	493	mk	8 J	4,17 kg	interscapulär	III	RK
31	495	wk	6 J	4,26 kg	Brustwand	III	RG
32	497	wk	3 J	3,30 kg	Brustwand	I	PK
33	498	mk	7 J	5,30 kg	interscapulär	II	PG
34	500	mk	11 J	5,50 kg	Brustwand	II	PG

Nr.: Nummer; wk: weiblich kastriert; mk: männlich kastriert; J: Jahre; kg: Kilogramm; PK: Primärtumor klein; PG: Primärtumor groß; RK: Rezidiv klein; RG: Rezidiv groß;

1.2. Kontrollgruppe

Im gleichen Zeitraum zwischen dem 17.01.2006 und dem 11.07.2007 wurden im Rahmen der Blockrandomisierung sechs Katzen als Kontrolltiere in die Studie aufgenommen. Um die Vergleichbarkeit zwischen Therapie- und Kontrolltieren bezüglich Toxizität und Effektivität zu erhöhen, wurden die chronologisch letzten 28 Katzen, die im Rahmen anderer Studien zum feline Fibrosarkom an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU als Kontrolltiere fungierten und der Blockrandomisierung nach Tumorklasse entsprachen, als „historische“ Kontrollen zur Gruppe der zu untersuchenden Kontrolltiere hinzugefügt. Somit betrug die Gesamtzahl der Patienten wie bei der Therapiegruppe 34 Tiere. Die Erweiterung der Kontrollgruppe bot sich an, da sich sowohl das Operations- und Beobachtungsprotokoll nicht von dem der anderen Kontrolltiere unterschied als auch das Operations- und Anästhesistenteam identisch war. Von den 34 Katzen der Kontrollgruppe waren 21 weiblichen und 13 männlichen Geschlechts. Auch in der Kontrollgruppe waren alle Tiere kastriert. Das Alter der Tiere in der Kontrollgruppe lag zwischen vier und 16 Jahren bei einem Durchschnittsalter von 9,6 Jahren. Das durchschnittliche Gewicht der Kontrollgruppe bei der Aufnahmeuntersuchung betrug 4,73 Kilogramm. Auch in der Kontrollgruppe befand sich der Tumor am häufigsten an den klassischen Impfstellen. So war er bei 13 Katzen zwischen den Schulterblättern, bei zehn Katzen an der lateralen Brustwand, bei zwei Katzen caudal der Schulterblätter und bei zwei Katzen auf dem Schulterblatt lokalisiert. Bei fünf Katzen war der Tumor an der Bauchwand zu finden, bei zwei Katzen in der Halsregion. Nach dem Tumorstaging wurden zwölf Katzen in Stadium I, elf Katzen in Stadium II und elf Katzen in Stadium III eingeteilt. Aufgrund der Blockrandomisierung war die Verteilung in die Tumorklassen innerhalb der Kontrollgruppe identisch mit der innerhalb der Therapiegruppe (siehe Tabelle 7). Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Kontrollgruppe.

Tabelle 7: Verteilung nach Tumorklasse innerhalb der Therapie- und Kontrollgruppe

Tumorklasse	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
kleiner Primärtumor	6	6
großer Primärtumor	16	16
kleines Tumorrezidiv	5	5
großes Tumorrezidiv	7	7

Tabelle 8: Kontrollgruppe

Kontrollkatze Nr.	laufende FSA Nr.	Geschlecht	Alter	Gewicht	Tumorlokalisation	Tumorstaging	Tumorklasse
1	40	wk	5 J	3,03 kg	interscapulär	II	PG
2	46	mk	7 J	4,67 kg	Brustwand	III	PG
3	47	mk	16 J	5,38 kg	Bauchwand	II	RG
4	49	mk	6 J	4,97 kg	Brustwand	II	RG
5	50	wk	7 J	4,51 kg	interscapulär	II	PG
6	84	mk	14 J	4,71 kg	auf der <i>Scapula</i>	III	RG
7	87	wk	13 J	3,35 kg	auf der <i>Scapula</i>	III	RG
8	105	mk	6 J	6,36 kg	Hals	II	PG
9	119	mk	11 J	4,95 kg	interscapulär	I	PK
10	126	wk	8 J	3,60 kg	interscapulär	I	RK
11	128	mk	12 J	5,00 kg	Brustwand	III	PK
12	161	wk	4 J	4,69 kg	interscapulär	III	PG
13	165	mk	9 J	4,89 kg	interscapulär	I	PK
14	168	mk	8 J	6,10 kg	Brustwand	I	RK
15	171	wk	7 J	4,72 kg	interscapulär	I	PG
16	179	wk	9 J	5,04 kg	Brustwand	III	PG
17	186	wk	14 J	3,65 kg	Brustwand	I	RK
18	194	wk	10 J	4,46 kg	caudal der <i>Scapulae</i>	II	PG
19	198	wk	12 J	4,40 kg	Bauchwand	II	PG
20	206	wk	10 J	6,98 kg	Hals	II	PG
21	207	mk	11 J	4,49 kg	interscapulär	III	PG
22	221	wk	10 J	7,25 kg	Bauchwand	I	RK
23	234	wk	12 J	3,49 kg	interscapulär	I	PK
24	235	wk	13 J	3,93 kg	Brustwand	II	PG
25	240	wk	8 J	5,47 kg	interscapulär	III	RG
26	317	wk	9 J	3,91 kg	Brustwand	II	RG
27	348	wk	11 J	5,20 kg	caudal der <i>Scapulae</i>	III	PG
28	356	mk	4 J	4,22 kg	interscapulär	I	PK
29	372	mk	10 J	4,68 kg	Brustwand	II	PG
30	441	wk	13 J	4,86 kg	interscapulär	I	PK
31	450	wk	8 J	3,80 kg	Bauchwand	III	PG
32	490	mk	6 J	4,89 kg	Bauchwand	III	RG
33	496	wk	10 J	4,59 kg	interscapulär	I	PG
34	505	wk	13 J	4,50 kg	Brustwand	I	RK

Nr.: Nummer; wk: weiblich kastriert; mk: männlich kastriert; J: Jahre; kg: Kilogramm; PK: Primärtumor klein; PG: Primärtumor groß; RK: Rezidiv klein; RG: Rezidiv groß;

2. Vergleich der Gruppen

Therapie- und Kontrollgruppe wurden anhand von Alter, Gewicht, Geschlecht, Tumorlokalisierung und Tumorstaging statistisch verglichen.

2.1. Vergleich nach Alter

Als Mittelwert für das Alter ergab sich ein Wert von 9,06 Jahren für alle 68 Katzen. Beim Kolmogorow-Smirnow-Test erwies sich das Alter bei allen Katzen mit einem p-Wert von 0,289 als normalverteilt. Abbildung 10 zeigt die Verteilung des Alters bei der Gesamtheit der Katzen.

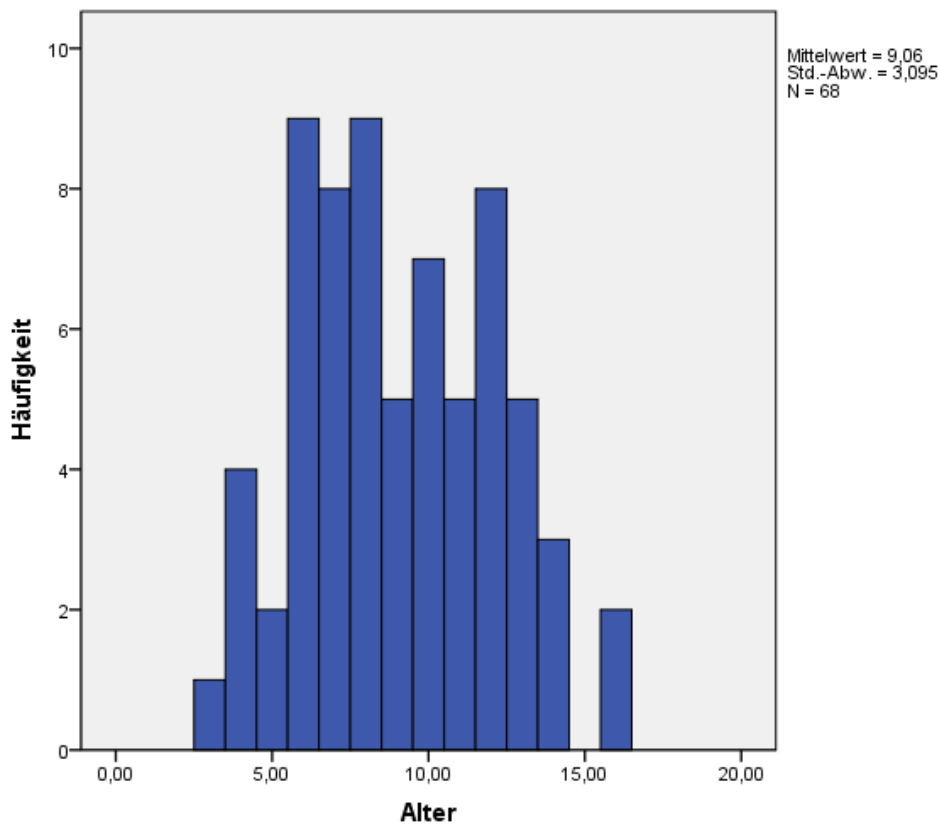


Abbildung 10: Verteilung des Alters bei der Gesamtheit der Katzen

Innerhalb der Therapiegruppe ergab sich für das Alter ein Mittelwert von 8,5 Jahren, innerhalb der Kontrollgruppe ein Mittelwert von 9,6 Jahren. Der t-Test bei unabhängigen Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte ergab einen p-Wert von 0,160. Somit waren die Gruppen in Bezug auf das Alter auf einem Signifikanzniveau von 0,05 vergleichbar. Abbildung 11 zeigt die Verteilung des Alters innerhalb der Kontroll- und innerhalb der Therapiegruppe.

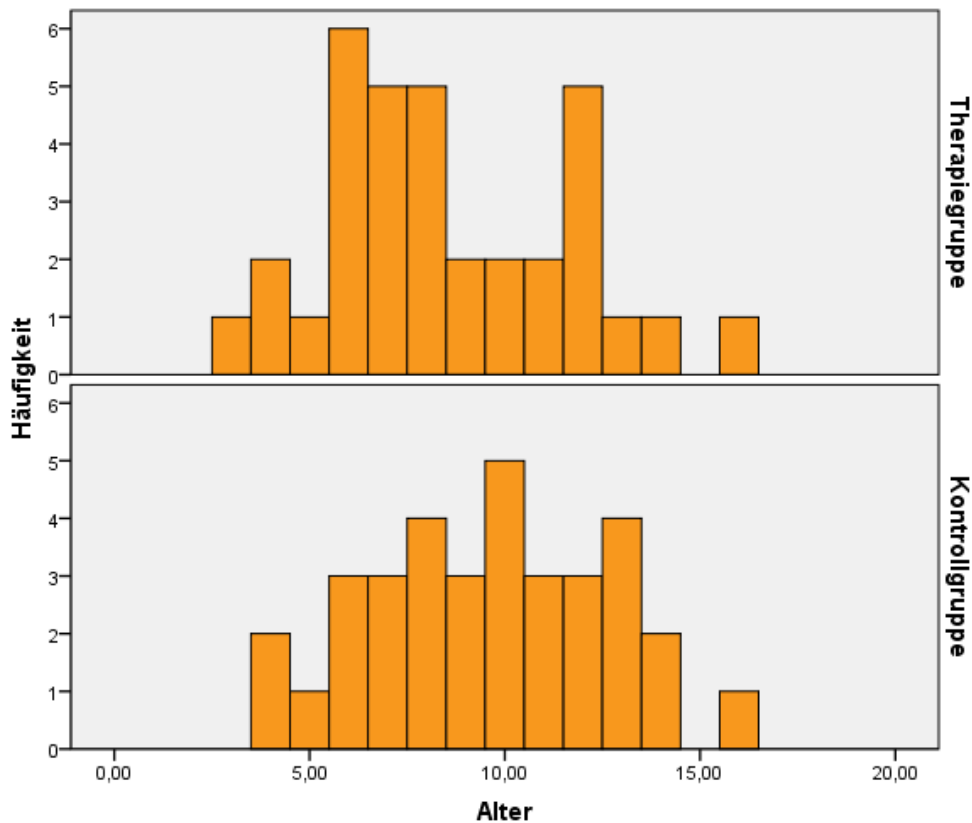


Abbildung 11: Verteilung des Alters innerhalb der Therapiegruppe (oben) und innerhalb der Kontrollgruppe (unten)

2.2. Vergleich nach Gewicht

Als Mittelwert für das Gewicht ergab sich bei den 68 Katzen ein Wert von 4,84 Kilogramm. Beim Kolmogorow-Smirnow-Test erwies sich das Gewicht bei allen Katzen mit einem p-Wert von 0,207 als normalverteilt. Abbildung 12 zeigt die Verteilung des Gewichts bei der Gesamtheit der Katzen.

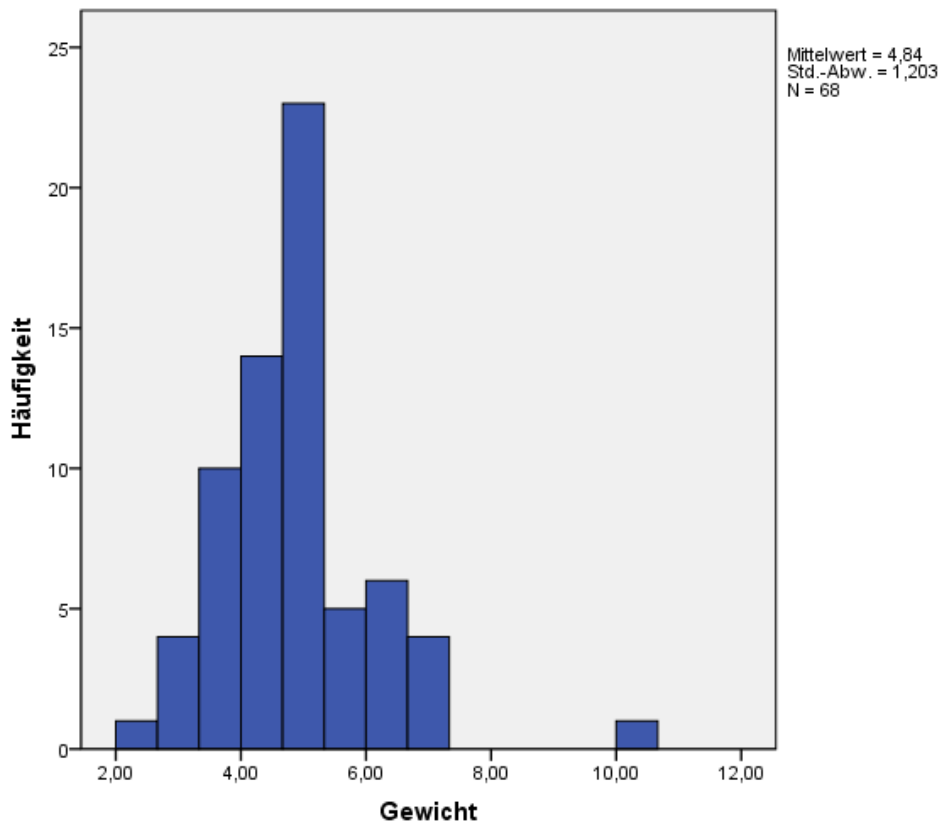


Abbildung 12: Verteilung des Gewichts bei der Gesamtheit der Katzen

Innerhalb der Therapiegruppe ergab sich für das Gewicht ein Mittelwert von 4,95 Kilogramm, innerhalb der Kontrollgruppe ein Mittelwert von 4,73 Kilogramm. Der t-Test bei unabhängigen Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte ergab einen p-Wert von 0,455. Somit waren die Gruppen in Bezug auf das Gewicht vergleichbar. Abbildung 13 zeigt die Verteilung des Gewichts innerhalb der Kontroll- und innerhalb der Therapiegruppe.

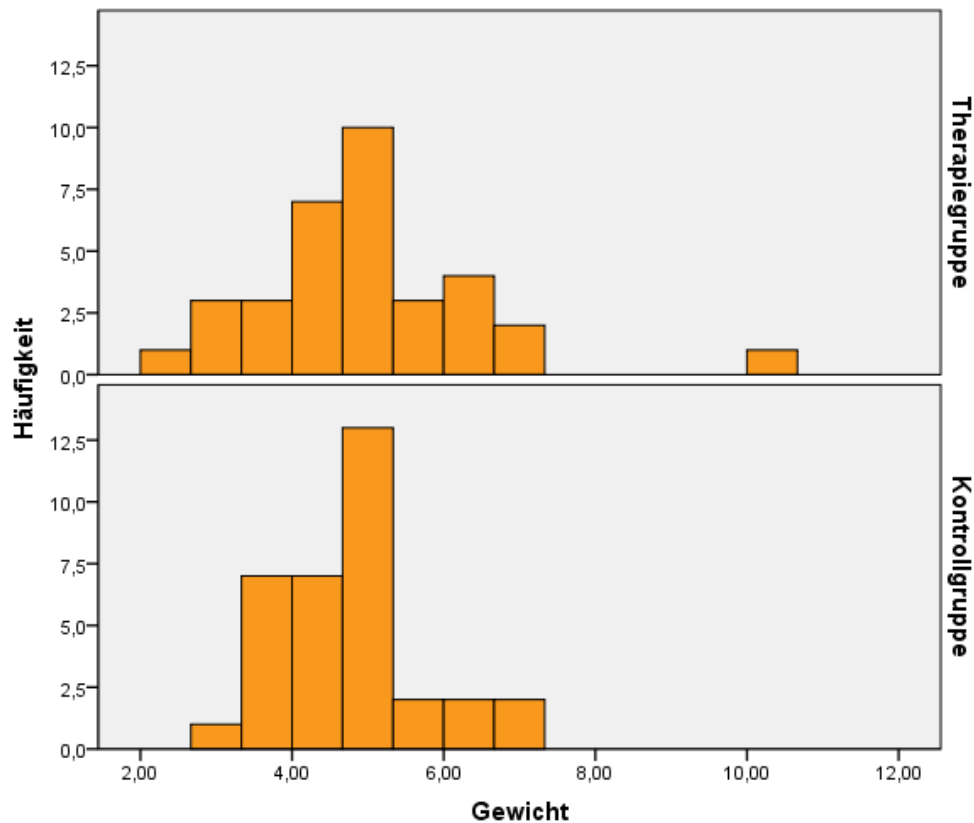


Abbildung 13: Verteilung des Gewichts innerhalb der Therapiegruppe (oben) und innerhalb der Kontrollgruppe (unten)

2.3. Vergleich nach Geschlecht

Bei allen 68 Katzen handelte es sich um kastrierte Tiere. Von den 34 Katzen der Therapiegruppe waren 17 männlichen und 17 weiblichen Geschlechts. In der Kontrollgruppe hingegen waren 21 Katzen weiblich und 13 männlich. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,329. Somit waren die Gruppen in Bezug auf das Geschlecht als vergleichbar anzusehen. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Verteilung nach Geschlecht innerhalb der Gruppen.

Tabelle 9: Verteilung nach Geschlecht innerhalb der Therapie- und Kontrollgruppe

Geschlecht	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
Weiblich	17	21
Männlich	17	13

2.4. Vergleich nach Tumorlokalisation

Auch bei der Verteilung bezüglich der Tumorlokalisation ergibt sich mit einem p-Wert von 0,764 beim Chi-Quadrat-Test eine statistisch signifikante Vergleichbarkeit. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Verteilung nach Tumorlokalisation innerhalb der Gruppen.

Tabelle 10: Verteilung nach Tumorlokalisation innerhalb der Therapie- und Kontrollgruppe

Tumorlokalisation	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
interscapulär	14	13
caudal der <i>Scapulae</i>	3	2
auf der <i>Scapula</i>	1	2
Brustwand	13	10
Hals	1	2
Bauchwand	2	5

2.5. Vergleich nach Tumorstaging

Beim Tumorstaging wurden von den 34 Therapietieren elf Katzen Stadium I, zwölf Katzen Stadium II und elf Katzen Stadium III zugeordnet. Bei den Kontrolltieren hingegen ergab sich eine Aufteilung von zwölf Katzen in Stadium I, elf Katzen in Stadium II und elf Katzen in Stadium III. Ein p-Wert von 0,957 beim Chi-Quadrat-Test ließ die Gruppen auch in Bezug auf das Tumorstaging als vergleichbar ansehen. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Verteilung nach Tumorstaging innerhalb der Gruppen.

Tabelle 11: Verteilung nach Tumorstaging innerhalb der Therapie- und Kontrollgruppe

Stadium	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
I	11	12
II	12	11
III	11	11

3. Toxizität

Tabelle 12 zeigt die veränderten Untersuchungsparameter nach der CTCAE-Tabelle innerhalb der Therapiegruppe, welche an d-14, d-7, d0, d14 und d45 beobachtet wurden. Die Zahlen geben jeweils die Häufigkeit an, mit welcher ein bestimmter Untersuchungsparameter zu einem bestimmten Grad verändert auftrat.

segment. Neutrophile ↓	5	1		6		
eos. Granulozyten ↑	4			9	1	
basophile Granulozyten ↑	4	1		2	2	
AST ↑				2		
Bilirubin ↑						
Albumin ↓						
Kreatinin ↑	1			1		
Glucose ↑	6	1		3	1	
Allergische Reaktion						
Gewicht ↓	8	3		9	3	
Lethargie	3					
Hyperthermie	1					
Anorexie	2		2	1		
Vomitus	3			2		
Diarrhoe	1			1		
Konstipation				1		
Wundheilungsstörung		1	2	1		1

Entsprechend zeigt Tabelle 13 die veränderten Untersuchungsparameter innerhalb der Kontrollgruppe. Aufgrund der fehlenden Vorlaufzeit von zwei Wochen *prae operationem* zeigt sie die Veränderungen an d0, d14 und d45. An d45 konnten wegen eines in der Vergangenheit noch anderen Kontrolluntersuchungsprotokolls die Daten von Kontrollkatze eins bis sieben nicht erhoben werden.

Tabelle 13: Beobachtungen in der Kontrollgruppe

Nebenwirkungen	d0(n=34)			d14(n=34)			d45(n=27)		
	Grad			Grad			Grad		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Hämoglobin ↓				1			1		
Hämatokrit ↓	1			2			2		
Thrombozyten ↑				2			1		
Thrombozyten ↓							2		
Leukozyten ↑	2			2			1		
Leukozyten ↓	10	6		5	5	1	6	2	
Monozyten ↑	2			1			4		
Lymphozyten ↑				1			1		
Lymphozyten ↓	1	5	3	3	5	2	2		2
stab. Neutrophile ↑	1						2		
segment. Neutrophile ↓	5			5	1	1	5		
eosinophile Granulozyten ↑	7			6			5		
basophile Granulozyten ↓	2	3					2	2	
AST ↑									
Bilirubin ↑	1			1					
Albumin ↓	1						2		

Kreatinin ↑		1		2		1	3	1	
Glucose ↑	13	2	1	8	1		9	2	1
Allergische Reaktion									
Gewicht ↓				5	8		3	1	2
Lethargie					1				
Hyperthermie	2			5					
Anorexie						1	1	1	
Vomitus									
Diarrhoe									
Konstipation									
Wundheilungsstörung					2	1			1

3.1. Blutparameter

Als Blutparameter wurden sowohl die Veränderungen im Blutbild, als auch die Veränderungen im Serumprofil untersucht.

3.1.1. Blutbildveränderungen

Die Untersuchungen der Blutbildveränderungen umfassten das rote und das weiße Blutbild.

3.1.1.1. Hämoglobinabfall

Drei Katzen der Therapiegruppe hatten einen Hämoglobinabfall von Grad 1 an d14. Dieser zeigte weder gegenüber d-14 der Therapiegruppe ($p=0,083$), noch gegenüber d14 der Kontrollgruppe ($p=0,681$) einen signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Hämoglobinabfall

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	$p=1,000$
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	$p=1,000$
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	$p=0,083$
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	$p=1,000$
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	$p=1,000$
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	$p=0,681$
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	$p=0,811$

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.1.2. Hämatokritabfall

Der Abfall des Hämatokrit wies einen signifikanten Unterschied innerhalb der Therapiegruppe zwischen d-14 und d14 auf ($p=0,035$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe an d14 war aber kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen ($p=0,139$). Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der statistischen Berechnungen.

Tabelle 15: Hämatokritabfall

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,705
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,035
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,083
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,536
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,139
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,772

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.1.3. Thrombozyten

Weder die beobachteten Thrombozytosen, noch die beobachteten Thrombozytopenien zeigten zwischen den Tagen der Therapiegruppe und zwischen den Tagen von Therapie- und Kontrollgruppe eine statistische Signifikanz (siehe Tabelle 16 und Tabelle 17).

Tabelle 16: Thrombozytose

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,665
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,665
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,536
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,995
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,965

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

Tabelle 17: Thrombozytopenie

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=0,157
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,544
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,840
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,840
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,772

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.1.4. Leukozyten

Tabelle 18 und 19 zeigen, dass es auch bei den aufgetretenen Leukozytosen und Leukozytopenien keine signifikanten Unterschiede gab.

Tabelle 18: Leukozytose

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,157
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,157
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,681
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,995
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,811

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

Tabelle 19: Leukozytopenie

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=0,480
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,377
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,308
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,097
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,792
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,760

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.1.5. Monozytose

Zwischen d-14 und d0 war innerhalb der Therapiegruppe eine statistisch signifikante Zunahme der Monozytosen zu beobachten ($p=0,034$). Während sie an d-14 bei keiner der Katzen vorzufinden war, zeigten an d0 vier Katzen eine Monozytose von Grad 1 und eine Katze von Grad 2. Ein Vergleich mit der Kontrollgruppe konnte für diesen Tag nicht erfolgen, da es keinen entsprechenden Tag bei der Kontrollgruppe gab. Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse der statistischen Berechnungen.

Tabelle 20: Monozytose

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,034
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,681
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=1,000
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,433

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.1.6. Lymphozyten

Bei den beobachteten Lymphozytosen waren die statistischen Vergleiche zwischen den Tagen der Therapiegruppe und zwischen den Tagen von Therapie- und Kontrollgruppe unauffällig (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Lymphozytose

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,564
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,840
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,840
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,811

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

Im Verlauf der Untersuchungen wurden bei der Therapiegruppe häufig Lymphozytopenien von Grad 3 beobachtet. So zeigten drei Katzen sowohl an d-7,

d0 und d14 und zwei Katzen an d45 eine Lymphozytopenie von Grad 3. Doch wiesen bereits sechs Katzen an d-14 eine solche auf und ließen deshalb keine statistische Signifikanz zu den Folgetagen erkennen. Auch in der Kontrollgruppe wurden häufig Lymphozytopenien beobachtet, weshalb kein statistisch signifikanter Unterschied zur Therapiegruppe berechnet wurde. Die Werte der statistischen Berechnungen finden sich in Tabelle 22.

Tabelle 22: Lymphozytopenie

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=0,428
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,796
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,632
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,943
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,995
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=1,000
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,135

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.1.7. Neutrophile Granulozyten

Eine Linksverschiebung von Grad 1 war bei einer Katze der Therapiegruppe an d-7 und jeweils von einer Katzen an d0 von Grad 1 beziehungsweise Grad 2 vorzufinden. Weder zwischen den Tagen der Therapiegruppe noch zwischen den Tagen von Therapie- und Kontrollgruppe war ein statistisch signifikanter Unterschied zu berechnen (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Linksverschiebung

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,180
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,840
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=1,000
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,627

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

An d0 fiel auf, dass bei Therapiekatze Nummer 11 eine Neutropenie von Grad 4 zu beobachten war. Gleichzeitig wurde bei dieser Katze eine Linksverschiebung

von Grad 2 festgestellt. Weder der Vergleich zwischen den Tagen der Therapiegruppe noch zwischen den Tagen von Therapie- und Kontrollgruppe erbrachte in Bezug auf Neutropenien einen statistisch signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Neutropenie

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=0,564
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,096
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,102
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,536
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,783
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,956

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.1.8. Eosinophilie

Die beobachteten Erhöhungen der eosinophilen Granulozyten im Blutbild bei den Therapiekatzen waren mild und meist von Grad 1. Eine statistische Signifikanz konnte weder zwischen den Tagen der Therapiegruppe, noch zwischen den Tagen von Therapie- und Kontrollgruppe errechnet werden (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Eosinophilie

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=0,705
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,180
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,414
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,096
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,840
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,681
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,450

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.1.9. Basophilie

An d-14 wurde bei sieben Therapiekatzen eine Erhöhung der basophilen Granulozyten von Grad 1 und bei fünf Katzen von Grad 2 beobachtet. An d-7 war nur noch bei einer Katze eine von Grad 1 und bei zwei Katzen von Grad 2

vorzufinden. Der Unterschied erwies sich bei einem p-Wert von 0,036 als statistisch signifikant. Zwischen d-14 und den übrigen Untersuchungstagen der Therapiegruppe war dieser Unterschied nicht mehr nachzuweisen. Auch zwischen den Basophilenzahlen der Therapie- und der Kontrollgruppe war kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen. Einen Überblick über die Berechnungen gibt Tabelle 26.

Tabelle 26: Basophilie

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=0,036
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,338
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,057
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,088
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,166
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,300
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,845

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.2. Veränderungen im Serumprofil

3.1.2.1. Erhöhung der Aspartat-Amino-Transferase

Zwei Therapiekatzen zeigten an d45 eine Erhöhung der Aspartat-Amino-Transferase von Grad 1. Ein statistisch signifikanter Unterschied zu Tag d-14 konnte nicht errechnet werden ($p=0,157$). Keine der Kontrollkatzen wies eine Veränderung in diesem Serumparameter auf. Tabelle 27 zeigt die statistischen Berechnungen.

Tabelle 27: Erhöhung der Aspartat-Amino-Transferase

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,157
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=1,000
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=1,000
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,700

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.2.2. Erhöhung des Bilirubins

An d0 konnte bei drei Katzen der Therapiegruppe eine Erhöhung des Bilirubins von Grad 1 festgestellt werden. Auch hier war kein statistisch signifikanter Unterschied zu d-14 nachweisbar (siehe Tabelle 28). Bei den Kontrollkatzen war nur bei einer Katze jeweils an d0 und d14 eine Erhöhung der Bilirubinkonzentration im Blut von Grad 1 aufzufinden.

Tabelle 28: Erhöhung des Bilirubins

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,083
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,840
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,840
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=1,000

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.2.3. Albuminabfall

Bei keinem Tier in der Therapiegruppe war ein Albuminwert unterhalb des Referenzbereichs zu beobachten, in der Kontrollgruppe bei einem an d0 und bei zwei Tieren an d45. Die statistischen Berechnungen waren auch hier unauffällig (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Albuminabfall

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,840
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=1,000
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,627

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.2.4. Erhöhung des Kreatinins

Zwei Tiere der Therapiegruppe wiesen an d-14 einen Kreatininwert oberhalb des Referenzbereichs auf. An den Folgetagen war der Kreatininwert nur noch bei jeweils einer Katze an d14 und d45 hoch. Hohe Kreatininwerte waren in der Kontrollgruppe zwar schwerwiegender und häufiger, ein statistisch signifikanter Unterschied konnte aber nicht festgestellt werden (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Erhöhung des Kreatinins

			p-Wert
d-14 (T)	im Vergleich zu	d-7(T)	p=0,157
d-14 (T)	im Vergleich zu	d0 (T)	p=0,157
d-14 (T)	im Vergleich zu	d14 (T)	p=0,564
d-14 (T)	im Vergleich zu	d45 (T)	p=0,564
d-14 (T)	im Vergleich zu	d0 (K)	p=0,849
d14 (T)	im Vergleich zu	d14 (K)	p=0,677
d45 (T)	im Vergleich zu	d45 (K)	p=0,429

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.1.2.5. Hyperglykämie

Hohe Blutglucosewerte waren an d-14 und d-7 in der Kontrollgruppe relativ häufig zu beobachten. So zeigten an d-14 elf Tiere eine Erhöhung von Grad 1 und zwei Tiere eine Erhöhung von Grad 2, an d-7 elf Tiere eine von Grad 1. Im Vergleich zu d0, d14 und d45 waren diese Veränderungen an diesen Tagen signifikant weniger vorzufinden. Im Vergleich zwischen den Tagen der Therapie- und Kontrollgruppe konnte an d45 ein statistisch signifikanter Unterschied berechnet werden, wobei an diesem Tag die Hyperglykämien in der Kontrollgruppe sowohl schwerwiegender als auch häufiger waren (siehe Tabelle 31).

Tabelle 31: Hyperglykämie

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=0,248
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,003
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,035
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,008
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,500
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,690
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,029

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.2. Anamnestisch und klinisch erfasste Nebenwirkungen

3.2.1. Allergische Reaktion

Therapiekatze Nummer 14 zeigte an d-14 unmittelbar nach der intratumoralen Injektion eine starke Salivation und Maulatmung. Der Allgemeinzustand der Katze besserte sich ohne medikamentöse Intervention rasch, so dass sie nach circa fünf Minuten wieder klinisch vollkommen unauffällig war. Bei der zweiten intratumoralen Injektion an d-7 zeigte dieselbe Katze nach der Injektion keine Auffälligkeiten. Bei allen anderen Therapiekatzen waren keine unmittelbar auf die intratumorale Injektion folgende klinisch erfassbaren Nebenwirkungen festzustellen. Die statistischen Berechnungen waren unauffällig (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32: Allergische Reaktion

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=0,840
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=1,000
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=1,000

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.2.2. Gewichtsverlust

Ein statistisch signifikanter Gewichtsverlust zu d-14 ergab sich bei der Therapiegruppe an d14 ($p=0,002$) und d45 ($p=0,001$). So wiesen acht Katzen einen Gewichtsverlust von Grad 1 und drei Katzen einen von Grad 2 an d14 auf. An d45 waren es neun Katzen mit einem Gewichtsverlust von Grad 1 und wiederum drei Katzen von Grad 2. An d-7 war bei einer Katze und an d0 bei zwei Katzen ein Gewichtsverlust von Grad 1 festzustellen, was keinen statistisch signifikanten Unterschied zu d-14 ergab. Auch in der Kontrollgruppe zeigten sich Gewichtsverluste an d14 und d45, welche in keinem statistisch signifikanten Unterschied zu den Tagen d14 und d45 der Therapiegruppe standen (siehe Tabelle 33).

Tabelle 33: Gewichtsverlust

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	$p=0,317$
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	$p=0,157$
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	$p=0,002$
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	$p=0,001$
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	$p=1,000$
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	$p=0,477$
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	$p=0,490$

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.2.3. Lethargie

An d-7 berichteten die Besitzer von vier Therapiekatzen leicht lethargisches Verhalten, welches bei drei Katzen in Grad 1, bei einer Katze in Grad 2 eingeordnet wurde. Auch an d0 und d14 beschrieben die Besitzer von jeweils drei Katzen milde lethargische Veränderungen, welche in Grad 1 eingeordnet wurden. Ein statistisch signifikanter Unterschied zu d-14 konnte nicht festgestellt werden. Auch in der Kontrollgruppe berichteten die Besitzer von einer Katze lethargisches Verhalten an d14, welches als Grad 2 eingeordnet wurde. Ein statistisch signifikanter Unterschied zu d14 der Therapiegruppe konnte nicht errechnet werden (siehe Tabelle 34).

Tabelle 34: Lethargie

			p-Wert
d-14 (T)	im Vergleich zu	d-7(T)	p=0,059
d-14 (T)	im Vergleich zu	d0 (T)	p=0,083
d-14 (T)	im Vergleich zu	d14 (T)	p=0,083
d-14 (T)	im Vergleich zu	d45 (T)	p=1,000
d-14 (T)	im Vergleich zu	d0 (K)	p=1,000
d14 (T)	im Vergleich zu	d14 (K)	p=0,695
d45 (T)	im Vergleich zu	d45 (K)	p=1,000

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.2.4. Hyperthermie

An d-14 wurde bei vier Katzen und an d-7 bei fünf Katzen der Therapiegruppe eine leicht erhöhte Körpertemperatur gemessen, was Grad 1 zugeordnet wurde. Im Vergleich von d-14 zu den Folgetagen ergab sich zu d0 und d45 ein signifikanter Unterschied (jeweils $p=0,046$), da an diesen Tagen bei keiner der Therapiekatzen eine Temperaturerhöhung festgestellt werden konnte. Im Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (siehe Tabelle 35).

Tabelle 35: Hyperthermie

			p-Wert
d-14 (T)	im Vergleich zu	d-7(T)	p=0,564
d-14 (T)	im Vergleich zu	d0 (T)	p=0,046
d-14 (T)	im Vergleich zu	d14 (T)	p=0,180
d-14 (T)	im Vergleich zu	d45 (T)	p=0,046
d-14 (T)	im Vergleich zu	d0 (K)	p=0,681
d14 (T)	im Vergleich zu	d14 (K)	p=0,408
d45 (T)	im Vergleich zu	d45 (K)	p=1,000

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.2.5. Anorexie

Die Beurteilung des Nebenwirkungsparameters Anorexie beruhte allein auf anamnestischer Erhebung. Nur bei wenigen Katzen der Therapiegruppe wurde von einer Veränderung der Nahrungsaufnahme berichtet. Die größten Abweichungen zum Aufnahmetag an d-14 ergaben sich an d14. Hier wurden zwei Katzen einem Grad 1 und zwei Katzen einem Grad 3 zugeordnet. Ein statistisch

signifikanter Unterschied zu d-14 konnte nicht errechnet werden, ebenso wenig zwischen den Tagen von Therapie- und Kontrollgruppe (siehe Tabelle 36).

Tabelle 36: Anorexie

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=0,180
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,063
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=1,000
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,544
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,766

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.2.6. Vomitus

Auch die Beurteilung des Nebenwirkungsparameters Vomitus erfolgte aufgrund der Vorberichte der Patientenbesitzern. Auch hier wurde bei der Therapiegruppe nur von wenigen Fällen berichtet, wobei sich die größten Abweichungen an d14 ergaben, an dem drei Katzen Grad 1 zugeordnet wurden. Eine statistische Signifikanz konnte weder zu d-14 noch zwischen den Tagen von Therapie- und Kontrollgruppe festgestellt werden (siehe Tabelle 37).

Tabelle 37: Vomitus

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=0,157
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,083
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,157
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=1,000
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,536
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,700

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.2.7. Kotabsatz

Diarrhoe und Konstipation wurde nur von Besitzern der Therapiegruppe im Vorbericht erwähnt. Von einer leichten Diarrhoe von Grad 1 wurde jeweils bei einer Katze an d14 und d45 berichtet, von einer milden Konstipation von Grad 1

bei einer Katze an d45. Ein statistisch signifikanter Unterschied zu d-14 konnte in keinem der Fälle nachgewiesen werden (siehe Tabelle 38 und Tabelle 39).

Tabelle 38: Diarrhoe

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=1,000
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=0,840
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,850

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

Tabelle 39: Konstipation

	p-Wert
d-14 (T) im Vergleich zu d-7(T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d14 (T)	p=1,000
d-14 (T) im Vergleich zu d45 (T)	p=0,317
d-14 (T) im Vergleich zu d0 (K)	p=1,000
d14 (T) im Vergleich zu d14 (K)	p=1,000
d45 (T) im Vergleich zu d45 (K)	p=0,850

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

3.2.8. Wundheilungsstörung

In der Therapiegruppe fand sich an d14 bei einer Katze eine Wundheilungsstörung von Grad 2, bei zwei Katzen von Grad 3 und bei einer Katze von Grad 4. An d45 schließlich war immer noch bei einer Katze (Therapiekatze Nummer 30) eine Wundheilungsstörung von Grad 3 und bei einer Katze (Therapiekatze Nummer 24) von Grad 4 festzustellen, die bei dieser eine erneute Adaption der Wundränder nötig machte. Bei beiden Katzen konnte nach antibiotischer Behandlung eine Wundheilung erzielt werden. Die statistischen Berechnungen innerhalb der Tage der Therapiegruppe waren unauffällig. Auch in der Kontrollgruppe wurden in der postoperativen Phase Wundheilungsstörungen beobachtet. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe konnte nicht errechnet werden (siehe Tabelle 40).

Tabelle 40: Wundheilungsstörung

			p-Wert
d-14 (T)	im Vergleich zu	d-7(T)	p=1,000
d-14 (T)	im Vergleich zu	d0 (T)	p=1,000
d-14 (T)	im Vergleich zu	d14 (T)	p=0,066
d-14 (T)	im Vergleich zu	d45 (T)	p=0,180
d-14 (T)	im Vergleich zu	d0 (K)	p=1,000
d14 (T)	im Vergleich zu	d14 (K)	p=0,811
d45 (T)	im Vergleich zu	d45 (K)	p=0,885

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe;

4. Effektivität

4.1. Betrachtung der Therapiegruppe

In der Therapiegruppe wurde bei 14 der insgesamt 34 Katzen innerhalb des Beobachtungsjahres ein Lokalrezidiv diagnostiziert. Das entspricht einer Rezidivrate von 41 % für den Zeitraum von einem Jahr. Von den übrigen 20 Katzen wurden zwei Katzen zensiert: Therapiekatze Nummer 2 wegen der Diagnose von Lungenmetastasen an d134 und Katze Nummer 14, weil sie an d141 entlaufen war und deswegen nicht weiter beobachtet werden konnte. Für die Therapiegruppe wurde eine mittlere rezidivfreie Zeit von 271 Tagen errechnet. Tabelle 41 zeigt das Auftreten von Lokalrezidiven innerhalb der Therapiegruppe.

Tabelle 41: Tumorrezidive in der Therapiegruppe

Therapiekatze Nr.	laufende FSA Nr.	Rezidiv bis d360	Rezidiv an d	Zensur an d	Grund der Zensur
1	374	nein			
2	377	nein		134	Lungenmetastasen
3	382	nein			
4	387	nein			
5	389	nein			
6	390	nein			
7	421	ja	360		

8	422	nein			
9	424	ja	45		
10	425	nein			
11	427	ja	270		
12	428	ja	99		
13	430	nein			
14	432	nein		141	Entlaufen
15	445	nein			
16	449	ja	45		
17	455	ja	270		
18	456	nein			
19	463	ja	65		
20	467	nein			
21	469	nein			
22	473	ja	94		
23	476	ja	90		
24	478	ja	45		
25	479	nein			
26	482	nein			
27	487	nein			
28	491	ja	360		
29	492	ja	45		
30	493	nein			
31	495	Ja	147		
32	497	Nein			
33	498	Nein			
34	500	Ja	120		

Nr.: Nummer; d: Tag;

4.2. Betrachtung der Kontrollgruppe

Von den 34 Katzen der Kontrollgruppe wurde bei 22 Katzen innerhalb des Beobachtungsjahres ein Lokalrezidiv diagnostiziert. Dies entspricht einer Rezidivrate von 65 % bis zum d360. Von den übrigen 12 Katzen wurde Kontrollkatze Nummer 29 zensiert, da sie an d146 von einem Mährescher überfahren wurde und dabei tödlich verunglückte. Für die Kontrollgruppe ergibt dies eine mittlere rezidivfreie Zeit von 222 Tagen. Tabelle 42 zeigt das Auftreten von Lokalrezidiven innerhalb der Kontrollgruppe.

Tabelle 42: Tumorrezidive in der Kontrollgruppe

Therapiekatze Nr.	laufende FSA Nr.	Rezidiv bis d360	Rezidiv an d	Zensur an d	Grund der Zensur
1	40	nein			
2	46	ja	281		
3	47	ja	176		
4	49	ja	169		
5	50	ja	23		
6	84	ja	60		
7	87	ja	90		
8	105	nein			
9	119	nein			
10	126	ja	45		
11	128	nein			
12	161	ja	180		
13	165	ja	234		
14	168	ja	90		
15	171	nein			
16	179	ja	180		
17	186	ja	35		
18	194	ja	90		
19	198	nein			
20	206	ja	270		
21	207	ja	45		
22	221	ja	180		
23	234	nein			
24	235	ja	180		
25	240	ja	90		
26	317	nein			
27	348	ja	360		
28	356	nein			
29	372	nein		146	Unfalltod
30	441	nein			
31	450	nein			
32	490	ja	180		
33	496	ja	90		
34	505	ja	252		

Nr.: Nummer; d: Tag;

4.3. Überlebenszeitanalyse

Der Log-Rang-Test zur Überlebenszeitanalyse erbrachte einen p-Wert von 0,072. Abbildung 14 zeigt die Kaplan-Meier-Funktionen für die Kontroll- und die Therapiegruppe.

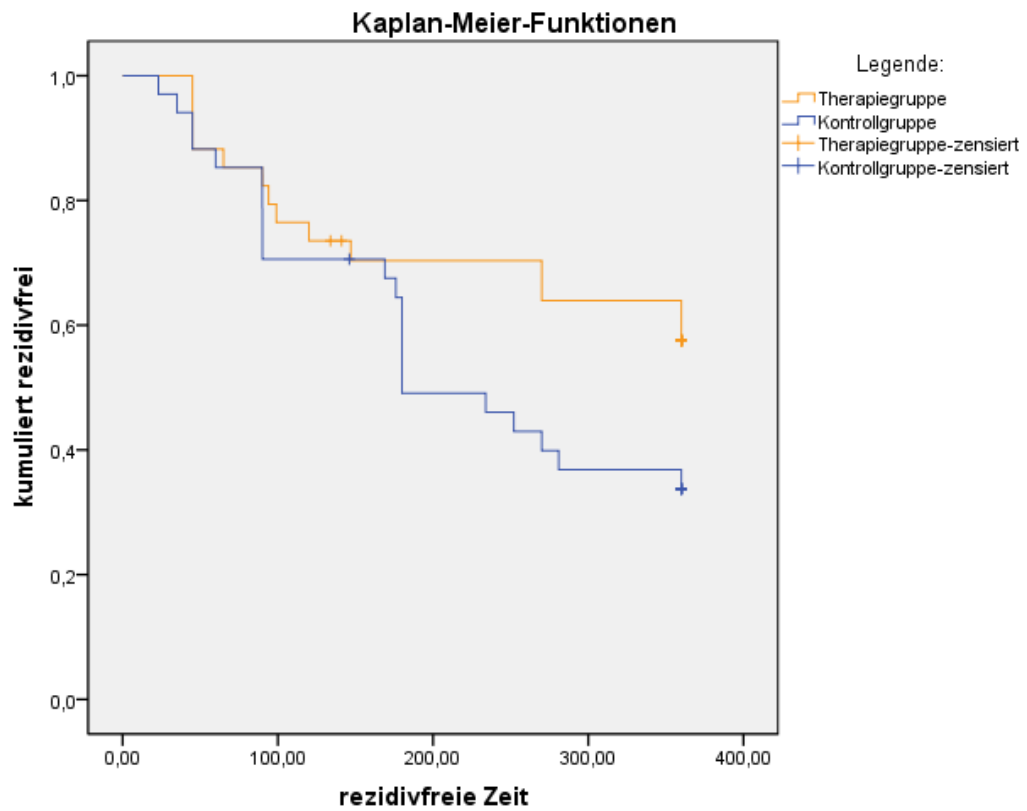


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Funktionen für Therapiegruppe (orange) und Kontrollgruppe (blau)

V. DISKUSSION

1. Das Fibrosarkom als Gegenstand der Forschung

Die Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten für das feline Fibrosarkom ist auf verschiedene Weise bedeutend und notwendig. So stellt das Fibrosarkom als zweithäufigster Tumor der Katze (KRAFT et al., 2003) und als Tumor mit einer hohen Rezidivrate trotz radikaler Operation für den Tierarzt eine besondere Herausforderung dar. Daneben führt der Zusammenhang zwischen Injektionen und Tumorentstehung zu einem Konflikt, indem für jedes Tier Risiko und Nutzen einer Injektion individuell abgewogen werden müssen. Diese iatrogene Komponente macht es dem Tierarzt oftmals schwierig, vor dem Hintergrund der Möglichkeit einer Tumorentstehung und dem Mangel an wirksamen Behandlungsmethoden für diesen Tumor den emotionalisierten Tierbesitzer von der Notwendigkeit von Impfungen und Injektionen zu überzeugen. Zwar haben wissenschaftliche Studien gezeigt, dass durch aggressive Tumorexstirpation mit postoperativen Bestrahlungen die Rezidivrate deutlich gesenkt werden kann, doch zum einen sind die Ergebnisse weiterhin als unbefriedigend anzusehen, zum anderen ist die Behandlung finanziell und logistisch sehr aufwendig. Somit ist die Suche nach alternativen Behandlungsmethoden eine notwendige Aufgabe der veterinärmedizinischen Forschung.

Auch für die Humanmedizin sind Forschungen zur Behandlung des feline Fibrosarkoms von großer Bedeutung, da es für sie ein einzigartiges Tumormodell darstellt (MCNIEL, 2001). So ist beim feline Fibrosarkom die Vergleichbarkeit zu humanen Tumoren höher als bei Tumoren, die bei Labortieren induziert werden, da das feline Fibrosarkom die Eigenschaft hat sowohl spontan als auch frequent aufzutreten. Auch die Lebensumgebung mit ihren kanzerogenen Einflüssen ist bei Katzen grundsätzlich der des Menschen ähnlicher als die bei Nagetieren in einer Laborumgebung. Außerdem sind die Eigenschaften des Tumors bezüglich Größe und Zellkinetik vergleichbarer (VAIL & MACEWEN, 2000). Darüberhinaus stellt das feline Fibrosarkom einen Tumor dar, für den eine Entzündungsreaktion als ätiologische Komponente als wahrscheinlich gilt. Auch in der Humanmedizin spielt eine solche Entzündungsreaktion bei einer Vielzahl von Tumoren eine entscheidende Rolle. So ist dort ein Auftreten von

Bronchialkarzinomen im Zuge von chronischer Raucherbronchitis, ein von Kolorektalkarzinomen im Zuge einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung in Zusammenhang mit Morbus Crohn, ein von Melanomen im Zuge von *Dermatitis solaris* und ein von Ösophaguskarzinomen im Zuge der gastro-ösophagealen Refluxkrankheit zu beobachten (HORZINEK, 2001, 2006).

2. Krebsimmuntherapie als alternative Behandlungsform

Nachdem die Beobachtungen von Coley, die er hinsichtlich der Tumorbekämpfung mit Hilfe des Immunsystems am Ende des 19. Jahrhunderts gemacht hatte, mit der Entwicklung der Strahlen- und Chemotherapie weitgehend in Vergessenheit geraten waren, rückte die Immuntherapie erst Mitte des 20. Jahrhunderts durch die Formulierung der *immunosurveillance*-Theorie wieder in das Bewusstsein der Forschung (LEVINE, 2008). Chemo- und Strahlentherapie haben den Nachteil, dass sie erhebliche zytotoxische Nebenwirkungen nach sich ziehen und keine gezielte Bekämpfung von Tumorzellen möglich machen. Die Ansätze im Bereich der Forschung der Krebsimmuntherapie verfolgen ein gezieltes Bekämpfen von Tumorzellen und versuchen sowohl aktiv als auch passiv eine Immunisierung des Körpers gegen Tumorzellen zu erreichen (BERGMAN, 2009). In der vorliegenden Studie wurde der Therapieansatz einer passiven, unspezifischen Immunstimulation verfolgt. Aufgrund vielversprechender Forschungsergebnisse gilt die Immuntherapie von Krebserkrankungen im Rahmen einer Multimodalitätstherapie als zukunftsweisend und scheint erst in ihren Anfängen zu stecken (WEINER, 2008).

3. Nonviraler Gentransfer

Der Einsatz von Plasmiden als nonvirale Vektoren erfolgte in der vorliegenden Studie aus mehreren Gründen. Als großer Nachteil des viralen Gentransfers erweist sich seine schlechte Anwendbarkeit in der tierärztlichen Praxis. So sind massive Sicherheitsbestimmungen mit der Produktion und dem Einsatz viraler Vektoren verknüpft, die aus logistischen und finanziellen Gründen einen Einsatz im normalen Klinikalltag unmöglich machen (NIIDOME & HUANG, 2002). Zusätzlich bergen virale Vektoren die Gefahr, durch Mutation ihre Replikationskompetenz wiederzuerlangen (ARGYLE, 1999). Virusneutralisierende Antikörper, die bei wiederholter Anwendung

möglicherweise auftreten, können zusätzlich einen Einsatz wirkungslos machen (NIIDOME & HUANG, 2002; MÜLLER-HEIDELBERG, 2003). Daneben werden häufig auch Nebenwirkungen beim Einsatz viraler Vektoren beschrieben. So kam es in der Vorgängerstudie von Wieland beim Einsatz von viralen Vektoren bei der Hälfte der Patienten zu Temperaturerhöhungen und auch eine Erhöhung der Aspartataminotransferase konnte bei einigen Katzen beobachtet werden (WIELAND, 2002). Somit erweisen sich nonvirale Vektoren im Gegensatz zu viralen Vektoren als sicherer, kostengünstiger und praktikabler in ihrer klinischen Anwendung.

4. Magnetofektion

Als großer Nachteil des nonviralen Gentransfers gegenüber dem viralen Gentransfer erweist sich seine geringe Effizienz und mangelnde Zielgerichtetheit (NIIDOME & HUANG, 2002). Um diese zu steigern wurde eine Reihe physikalischer Verfahren entwickelt wie *electroporation* und *gene gun* (SUN et al., 1995; SOMIARI et al., 2000; EL-ANEED, 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte die Effizienz und Zielgerichtetheit durch Magnetofektion erhöht werden. Die in der Literaturübersicht aufgeführten Studien zur Magnetofektion zeigen sowohl in vitro als auch in vivo eine deutliche Steigerung der Transfektionsrate gegenüber einfacher Plasmidinjektion (SCHERER et al., 2002). Auch hinsichtlich der Verträglichkeit der injizierten Magnetofektine zeigen bisherige Studien gute Ergebnisse. So konnten weder in den Studien von JAHNKE und Mitarbeitern und HÜTTINGER und Mitarbeitern bei Hauskatzen noch in Untersuchungen bei Labortieren, wie Mäusen, Kaninchen und Schafen erwähnenswerte Nebenwirkungen festgestellt werden (SCHERER et al., 2002; ALEXIOU et al., 2007; JAHNKE et al., 2007; PETRI-FINK & HOFMANN, 2007; HÜTTINGER et al., 2008; JAIN et al., 2008). Die in dieser Studie aufgetretene Komplikation von Therapiekatze Nummer 14, die unmittelbar nach der Injektion kurzzeitig mit Maulatmung und Salivation reagierte, kann auf eine anaphylaktoide Reaktion aufgrund der injizierten Nanopartikel zurückgeführt werden. Zwar machte die kurze Dauer keine medikamentöse Intervention notwendig, doch zeigt dies, dass eine gründliche tierärztliche Überwachung nach der Injektion der Magnetofektine notwendig ist.

GM-CSF kann beim Überschreiten eines bestimmten systemischen Schwellenwertes immunsuppressive Effekte nach sich ziehen (SERAFINI et al., 2004). Magnetofektion bietet eine Möglichkeit, durch lokale Zielsteuerung der Plasmide eine systemische Transfektion und somit ein Überschreiten des systemischen Schwellenwertes zu verhindern.

Im Vergleich zu den oben erwähnten physikalischen Methoden zur Steigerung der Transfektionsrate wie *electroporation* oder *gene gun* bedarf es bei der Magnetofektion keiner aufwändigen Gerätschaften, sondern nur eines Magneten, was den Einsatz in der tierärztlichen Praxis praktikabel erscheinen lässt.

Darüberhinaus ist eine Sedation oder Narkose des Patienten beim Einsatz der Magnetofektion nicht notwendig, was sowohl die Sicherheit für den Patienten als auch die Praktikabilität gegenüber den anderen Methoden erhöht.

5. Intratumorale Injektion

Neben einer intratumoralen Injektion wären auch andere Applikationsarten wie subcutane, peritumorale oder intravenöse Injektion denkbar. Die Wahl dieser Methode stützt sich auf Ergebnisse, die in mehreren Studien zu unterschiedlichen Applikationsarten im Bereich des Gentransfers und der Immuntherapie von Tumorerkrankungen gemacht wurden. So beobachteten KUDO-SAITO und Mitarbeiter beim Vergleich der Effektivität von intratumoraler mit subcutaner Injektion einen deutlichen Vorteil der intratumoralen Applikationsart bezüglich der Antitumor-Aktivität. Am effektivsten erwies sich aber eine Kombination beider Applikationsarten (KUDO-SAITO et al., 2004). Ebenso konnte in der Dissertation von MÜLLER-HEIDELBERG zum immunologischen Monitoring einer Gentherapie beim Fibrosarkom der Katze mittels adenoviraler Vektoren eine höhere Transfektionsrate und somit höhere Zytokinkonzentration bei präoperativer intratumoraler Injektion im Vergleich zu postoperativer subcutaner Injektion festgestellt werden (MÜLLER-HEIDELBERG, 2003). In einer Studie von JACOBS und Mitarbeitern zeigte eine intratumorale gegenüber einer peritumoralen Applikation von IL-2 bei Mäusen mit subcutanem Lymphom Vorteile bezüglich der Antitumor-Aktivität (JACOBS et al., 2005). Eine intravenöse Applikationsform wurde wegen der bereits erwähnten immunsuppressiven Effekte von GM-CSF bei erhöhten systemischen Werten ausgeschlossen (SERAFINI et al., 2004).

In der bereits erwähnten Studie von KEMPF, welche im Rahmen der immunstimulatorischen Studien zum felinen Fibrosarkom an der LMU durchgeführt wurde, kam ein mit Plasmiden beschichteter Kollagenschwamm zum Einsatz, der nach Tumorexstirpation in das Wundbett eingebracht wurde. Hierbei wurde bei zwei der insgesamt 15 Katzen eine Serombildung beobachtet, welche mit einer Fremdkörperreaktion auf den eingesetzten Kollagenschwamm in Verbindung gebracht wurde (KEMPF, 2005). Der Einsatz dieser Applikationsform wurde somit in den Folgestudien nicht weiter verfolgt.

Um eine effektive Immunität des Körpers gegenüber den Tumorantigenen zu erreichen, wurde in dieser Studie eine zweimalige intratumorale Injektion angewendet, welche im Sinne eines *booster*-Effekts wirken sollte. In einer humanmedizinischen Studie zum Prostatakarzinom konnte die Effektivität einer zweimaligen intratumoralen Injektion nachgewiesen werden, indem sich erst nach der zweiten Applikation ein deutlicher Abfall des Prostataspezifischen Antigens (PSA), eines Tumormarkers, im Blut der Patienten zeigte (MILES et al., 2001).

6. Nebenwirkungen

In der vorausgegangenen Phase-I-Studie von HÜTTINGER und Mitarbeitern wurden nur milde Nebenwirkungen in Form von Lethargie, Anorexie und Vomitus beschrieben. Diese wurden bei drei der insgesamt acht Katzen der höchsten Dosisgruppe von 1250 µg GM-CSF an d-7 und d0 beobachtet und als möglicherweise mit der Therapie in Verbindung stehend beurteilt (HUTTINGER et al., 2008). Auch in der vorliegenden Phase-II-Studie, bei der GM-CSF in derselben Dosierung verabreicht wurde, konnten diese Symptome bei einigen Therapiekatzen beobachtet werden. So zeigten fünf Katzen an d-7 entweder Vomitus, Anorexie, Lethargie oder eine Kombination dieser Symptome, an d0 sechs Katzen entweder Vomitus, Anorexie oder Lethargie. In allen Fällen waren diese als mild einzustufen (entweder Grad 1 oder Grad 2) und selbstlimitierend. Im statistischen Vergleich zum Aufnahmetag zeigte sich bei keinem der beobachteten Symptome eine Signifikanz, weswegen sie als vielleicht mit der Therapie in Zusammenhang stehend beurteilt werden sollten. Noch häufiger wurden diese Symptome an d14 von den Besitzern der Therapiegruppe beschrieben, aber auch die Katzen der Kontrollgruppe zeigten diese Symptome in gleichem Maße, weshalb das Auftreten der Symptome eher mit der

vorausgegangenen, großen Operation als mit der immunologischen Gentherapie in Zusammenhang gestellt werden muss. Auch die Veränderungen bezüglich Hämoglobinabfall, Hämatokritabfall und der zum d-14 statistisch signifikante Gewichtsverlust in der Therapiegruppe an d14 sollten aufgrund der Vergleiche mit der Kontrollgruppe den Belastungen durch die Operation zugeschrieben werden. Der Gewichtsverlust kann viele mit der Operation in Zusammenhang stehende Gründe haben, letztendlich gehört auch dazu, dass Gewebe entfernt wurde. Entsprechend sind auch die im Zuge der Operation aufgetretenen Wundheilungsstörungen an d14 und d45 in der Therapiegruppe zu beurteilen, welche vergleichbar auch in der Kontrollgruppe aufgetreten waren.

Neben den bereits erwähnten Nebenwirkungen wie Hämatokrit- und Hämoglobinabfall sind auch die anderen Veränderungen im roten Blutbild wie Thrombozytosen und Thrombozytopenien als wahrscheinlich nicht mit der Therapie in Zusammenhang stehend zu beurteilen. Ihr Charakter war stets selten und milde, ein gehäuftes Auftreten zur Aufnahmeuntersuchung an d-14 konnte nicht festgestellt werden.

Bei der Betrachtung des weißen Blutbilds fällt auf, dass an d-14 acht Tiere der Therapiegruppe eine Erniedrigung der Lymphozyten aufwiesen, während es an den Folgetagen d-7, d0, d14 und d45 jeweils 15, zehn, zehn und 13 Tiere waren. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Aufnahmeuntersuchungstag und den Folgetagen hingegen konnte dabei nicht festgestellt werden. Die Ursache ist darin zu sehen, dass die Lymphozytopenien der Aufnahmeuntersuchungen meist von einem schwereren Grad waren und somit mit den Lymphozytopenien der Folgeuntersuchungen statistisch vergleichbar waren. Auch in der Dissertationsschrift von KEMPF wurde eine Zunahme der Lymphozytopenien in den höheren Dosisgruppen beobachtet. Diese wurde mit der Wirkung des in dieser Studie verwendeten IL-2-Gens begründet, welches als exprimiertes IL-2 eine Tumornekrosefaktor-alpha-Sekretion und somit vor allem einen Abfall der B-Lymphozyten induziert (KEMPF, 2005). Da in der vorliegenden Studie weder das IL-2-Gen zum Einsatz kam, noch eine statistische Signifikanz zwischen den Tagen innerhalb der Kontrollgruppe und den Tagen zwischen Therapie- und Kontrollgruppe errechnet werden konnten, sind die Veränderungen bezüglich der Lymphozytopenien als wahrscheinlich nicht mit der Therapie in Zusammenhang stehend zu beurteilen. Auch die beobachteten

Lymphozytosen und Veränderungen an den Gesamtleukozytenzahlen sind ebenso zu bewerten. Dem gegenüber ist eine statistisch signifikante Zunahme der Monozytosen im weißen Blutbild zu beobachten. Während an d-14 und d-7 keine der Therapiekatzen eine solche aufwies, waren es an d0 vier Katzen von Grad 1 und eine Katze von Grad 2. Ein Vergleich mit der Kontrollgruppe konnte nicht durchgeführt werden, da es keine entsprechenden Tage nach Genterapie gab. Die Zunahme der Monozytosen lässt sich auf eine Wirkung von exprimiertem GM-CSF zurückführen, welches als Wachstumsfaktor die Produktion, Proliferation und Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen von Monozyten stimuliert (BUCHSEL et al., 2002). Ebenso sollte sich diese Wirkung auch auf eine Zunahme der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten auswirken, welche zwar an d0 in Form von geringgradigen Neutrophilien und Eosinophilien beobachtet werden konnten, aber sich nicht statistisch signifikant von den Werten der Vortage unterschieden. Die beobachteten Monozytosen sollten somit als möglicherweise auf die Therapie zurückführend betrachtet werden. Die größte Abweichung im weißen Blutbild zeigte Therapiekatze Nummer 11 an d0 mit einer Neutropenie der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten, welche einem Grad 4 zugeordnet wurde. Gleichzeitig zeigte sie eine deutliche Linksverschiebung von Grad 2. Als Ursache kann eine akute Entzündungsreaktion angenommen werden, deren Ursprung klinisch nicht erfassbar war. Auch eine Nebenwirkung der immunologischen Genterapie kann hierbei nicht ausgeschlossen werden. Besonders auffällig ist auch die statistisch signifikante Abnahme der beobachteten Basophilien der Therapiegruppe von d-14 zu d-7. Während sie bei der Aufnahmeuntersuchung noch bei zwölf Katzen vorzufinden waren, konnten sie an d-7 nur noch bei drei Katzen nachgewiesen werden. Zwar waren auch an den Folgetagen die Basophilien weiterhin weniger vorzufinden, eine statistische Signifikanz ergab sich aber nicht mehr. Eine Erklärung für diese Beobachtung konnte nicht gefunden werden, so dass sie als vielleicht mit der Therapie in Zusammenhang stehend beurteilt werden sollten.

Die Nebenwirkungen, die in den Veränderungen im Blutserum der Therapiekatzen beobachtet wurden, wie Erhöhungen der AST, des Bilirubins und des Kreatinins waren mild und selten. So zeigten nur zwei Katzen an d45 eine Erhöhung der AST, drei Katzen an d0 eine Erhöhung des Bilirubins und jeweils eine Katze eine Erhöhung des Kreatinins an d14 und d45. In allen Fällen wurden

die Beobachtungen einem Grad 1 zugeordnet und die statistischen Berechnungen waren unauffällig. Eine Korrelation mit der Therapie sollte somit als unwahrscheinlich gelten.

Interessant sind auch die Veränderungen in der Therapiegruppe bezüglich Hyperthermie und Hyperglykämie zwischen d-14 und den Folgetagen d0, d14 und d45. Für diese ergab sich meist eine signifikante Veränderung im Sinne eines Wenigerauftretens dieser Nebenwirkungen. Hyperthermie und Hyperglykämie lassen sich am ehesten durch besonderen Stress am d-14 erklären. Zur Hyperglykämie ist zudem anzumerken, dass sich die Katzen am d-14 in einer völlig neuen Umgebung befanden und die Dauer bis zur Blutabnahme aufgrund der vorher stattgefundenen klinischen Untersuchungen länger als an den Tagen der Kontrolluntersuchungen war. Der Blutzucker kann daher während der Untersuchungen angestiegen sein. Ein Diabetes mellitus wurde für alle Katzen mit erhöhten Blutglucosewerten durch Bestimmung des Blutfuctosaminwertes ausgeschlossen. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei den Kontrollkatzen gemacht werden, weswegen sie offensichtlich nicht auf die Therapie zurückzuführen sind.

Als einzige Nebenwirkungen, welche als sicher mit der Therapie in Zusammenhang stehend betrachtet werden müssen, sind die beobachtete Hypersalivation und Tachypnoe von Therapiekatze Nummer 14 anzusehen, die unmittelbar auf die erste intratumorale Injektion erfolgten. Als Ursache kann eine anaphylaktoide Reaktion im Sinne einer Pseudoallergie oder eine anaphylaktische Reaktion im Sinne einer Typ-I-Allergie angenommen werden. Für eine Typ-I-Allergie muss ein Erstkontakt und somit eine Sensibilisierung mit dem Allergen erfolgen, bevor eine anaphylaktische Reaktion des Körpers stattfinden kann. Da die Reaktion bei der ersten Medikamentenapplikation auftrat, ist eine Beteiligung von Eisenoxid-Nanopartikeln oder von PEI als Allergen auszuschließen, denn ein vorher stattgefunderer Erstkontakt ist als unwahrscheinlich anzusehen. Somit kommt für eine allergische Reaktion nur das von Bakterien stammende Plasmidgen beziehungsweise Teile des Plasmidgens als auslösendes Antigen in Frage. Im Gegensatz dazu bedarf es bei einer Pseudoallergie, bei der eine Histaminausschüttung nicht Antikörper-vermittelt ist, keines Erstkontaktes. Somit kommen hierbei alle Bestandteile der Injektionslösung als auslösendes Agens in Betracht. Ein Ausbleiben dieser Reaktionen bei der zweiten intratumoralen

Anwendung bei derselben Katze kann mit einer diesmaligen Injektion in die nekrotischen Anteile des Tumors erklärt werden. Auch akuter Stress und mit der Injektion verbundener Schmerz kann als Auslöser von Hypersalivation und Tachypnoe in Betracht gezogen werden. Zwar wurden diese Nebenwirkungen nur bei einer Katze beschrieben und der Verlauf war selbstlimitierend, doch zeigen sie, dass eine gründliche tierärztliche Überwachung des Patienten erforderlich ist, die eine sofortige Schocktherapie ermöglichen würde.

Von den anderen in der Literatur beschriebenen Nebenwirkungen von GM-CSF wie Kapillar-Leck-Syndrom oder lokale Reaktionen am Injektionsort war keine zu beobachten (EMMINGER et al., 1990; AL-HOMAIDHI et al., 1998; BUCHSEL et al., 2002; RINI et al., 2003).

7. Rezidivrate

Von den bisher verfügbaren Therapieoptionen für das feline Fibrosarkom wurden die bisher besten Ergebnisse in Bezug auf die Einjahresrezidivrate beim Einsatz einer neoadjuvanten Bestrahlung beobachtet. Hierbei ergaben sich Rezidivraten von 41 - 54 % (CRONIN et al., 1998; COHEN et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2002). Im Vergleich dazu ist die in dieser Studie ermittelte Rezidivrate von 41 % in der Therapiegruppe als ein positives Ergebnis zu bewerten. Auch im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der eine Einjahresrezidivrate von 65 % ermittelt wurde, ist das Ergebnis als sehr gut anzusehen. Diese entspricht in etwa der in der Literatur beschriebenen Rezidivrate von bis zu 70 % bei alleiniger chirurgischer Tumorexstirpation (BOSTOCK & DYE, 1979; MCENTEE & PAGE, 2001). Zwar wurde beim Log-Rang-Test, der die beiden Gruppen in Bezug auf das Auftreten eines Rezidivs bis zum Tag 360 verglich, eine statistische Signifikanz der Unterschiede mit einem p-Wert von 0,072 verfehlt, doch lässt sich hieraus zumindest eine Tendenz ablesen. Auch die Kaplan-Meier-Kurve, bei der sich die zwei Graphen von Therapie- und Kontrollgruppe nicht kreuzen, lässt diese positive Tendenz erkennen. Als Grund für den nicht signifikanten Log-Rank-Test trotz deutlicher Abweichungen der Rezidivraten sind die geringen Gruppengrößen zu sehen. Bei unveränderten Rezidivraten wäre somit erst ab einer Größe von 128 Katzen je Gruppe eine statistische Signifikanz erkennbar. Für entsprechende Phase-III-Studien aus der Humanmedizin, die einen signifikanten Wirkungsnachweis als Ziel verfolgen, werden neue Medikamente meist bei 200

bis 10.000 Personen untersucht. Somit sollte ein Verfehlen der statistischen Signifikanz bei der in dieser Studie vorkommenden Gruppengrößen nicht überbewertet werden.

Die besten Ergebnisse in Bezug auf die Rezidivrate bei der Therapie des felinen Fibrosarkoms wurden bisher in der Studie von JOURDIER und Mitarbeitern erreicht, bei der Werte von 28 – 39 % beobachtet wurden. Hierbei kam eine Kombination aus Operation, Brachyradiotherapie und Gentherapie zum Einsatz (JOURDIER et al., 2003). Vor diesem Hintergrund sollte in zukünftigen Studien die Wirksamkeit der in dieser Arbeit verwendeten Verfahren in Verbindung mit Radiotherapie untersucht werden.

8. Schlussbetrachtung

Die Methode des nonviralen Gentransfers mittels Magnetofektion hat sich als ambulant gut durchführbare Methode erwiesen. Denn sie war zum einen für die Patienten gut verträglich, zum anderen wurde ihr eine große Akzeptanz seitens der Besitzer entgegengebracht. Somit erfüllt sie wichtige Voraussetzungen für den Einsatz in der tierärztlichen Praxis.

Die Planung und Durchführung der vorliegenden Studie sind ebenso als insgesamt sehr positiv zu bewerten. Trotzdem sollten einige wenige Schwachpunkte angesprochen werden:

So stellt das Heranziehen von „historischen“ Kontrolltieren trotz der exakten Zuteilung in die Tumorklassen der Therapiegruppe keine optimale Vergleichbarkeit mit der Therapiegruppe her.

Die unterschiedlichen Vorlaufzeiten erschwerten eine Blindung der behandelnden Tierärztinnen und Tierärzte. Diagnostische und therapeutische Entscheidungen mussten daher immer von separaten, „geblindeten“ Tierärztinnen und Tierärzten getroffen werden, um eine absolute Objektivität zu wahren.

Aufgrund ethischer Grundsätze wurde die Kontrollgruppe nicht mit einem Placebopräparat behandelt. Ein Tumorpatient sollte immer so schnell wie möglich der notwendigen Tumorexstirpation zugeführt werden. Wenn keine neoadjuvanten Therapien anstehen (Chemo- oder Strahlentherapie), dann ist ein Aufschieben der Operation ethisch nicht vertretbar.

Ebenso waren die Patientenzahlen sowohl in der Studien- als auch in der Kontrollgruppe zu gering für eine Studie zum Effektivitätsnachweis einer neuen Therapie.

Ferner wäre eine zusätzliche Vergleichsgruppe interessant gewesen, die die zur Zeit effektivste Therapieform, in diesem Fall eine Radiotherapie, erhalten hätte. Eine Radiotherapie steht der Tierärztlichen Fakultät der LMU aber derzeit noch nicht zur Verfügung. Daher konnte diese Therapie nicht angeboten werden. Allen Katzenbesitzern wurde im Aufklärungsgespräch mitgeteilt, dass die optimale Therapie auch als Zusatz eine Radiotherapie beinhalten würde und den Katzenbesitzern wurden die nächstgelegenen Tierkliniken, die eine Megavoltage-Radiotherapie anbieten (Hofheim im Taunus, Wien, Zürich), genannt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass von beiden Zielen, die mit dieser Studie verfolgt wurden, mindestens eines mit Sicherheit erreicht wurde. So konnte die in der vorausgegangenen Phase-I-Studie ermittelte Unbedenklichkeit der Therapie bestätigt werden. Die hierbei ermittelten Nebenwirkungen waren milde und meist nicht mit der Therapie in Zusammenhang zu bringen. Im Gegensatz dazu konnte zwar keine statistisch signifikante Effektivität der Therapie nachgewiesen werden, doch war eine klare Tendenz, die auf eine Wirksamkeit hindeutet, auszumachen. Eine Erhöhung der Patientenzahlen in einer zukünftigen Phase-III-Studie sollte über die Wirksamkeit letztendlich Klarheit bringen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das feline Fibrosarkom gehört zu den häufigsten und bösartigsten Tumoren in der tierärztlichen Praxis. Bei alleiniger chirurgischer Tumorexstirpation werden Rezidivraten von bis zu 70 % beobachtet. Zwar kann durch adjuvante Radiotherapie eine deutliche Verbesserung der Rezidivrate erreicht werden, doch erweist sie sich in ihrer Anwendung als arbeitsaufwendig und kostspielig. In der vorliegenden prospektiven Phase-II-Studie wurde der Therapieansatz einer neo-adjuvanten immunstimulierenden Gentherapie verfolgt. Für die Transfektion des feline Zytokingens GM-CSF kam ein nonviraler Gentransfer mittels Magnetofektion zum Einsatz. Nachdem in der vorausgegangenen Phase-I-Studie in der höchsten Dosisstufe von 1250 µg GM-CSF-Plasmid nur milde Nebenwirkungen beobachtet wurden, konnte diese als maximal tolerierbare Dosis für eine Folgestudie festgelegt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte zum einen die Unbedenklichkeit der immunstimulierenden Gentherapie überprüft, zum anderen ihre Effektivität nachgewiesen werden.

Die Patienten wurden nach fest definierten Einschlusskriterien ausgewählt und zweimalig mit der immunstimulierenden Gentherapie behandelt. Hierfür wurden die Plasmide in wässriger Lösung in einem 1:1-Verhältnis mit magnetischen Nanopartikeln gemischt und in einem Volumen von 500 µl intratumoral injiziert. Danach wurde durch Applikation eines Neodymium-Eisen-Bor-Magneten auf das Tumorgebiet ein Magnetfeld für die Dauer von einer Stunde induziert. Dadurch sollte die Transfektion auf das Tumorgebiet beschränkt und die Effektivität des Gentransfers verbessert werden. Die Behandlungen wurden an den Tagen -14 und -7 durchgeführt, die chirurgische Tumorexstirpation an Tag 1. Untersuchungen auf mögliche Nebenwirkungen erfolgten an den Tagen -7, 0, 14 und 45, Untersuchungen auf das Auftreten von Tumorrezidiven an den Tagen 14, 45, 90, 180, 270 und 360. Klinische oder hämatologische Toxizitäten wurden anhand eines speziellen Nebenwirkungskatalogs (VCOG-CTCAE) erfasst und eine Korrelation zur durchgeführten Therapie diskutiert. Eine gleichgroße Kontrollgruppe wurde nach prognostischen Merkmalen wie Tumorgröße und Wiederauftreten aus „historischen“ Kontrolltieren entsprechend der Therapiegruppe sortiert und einer Operation ohne Zusatztherapie unterzogen. Aus ethischen Gründen wurde bei ihr auf eine Vorlaufzeit von zwei Wochen vor der

Operation und auf die Applikation eines Placebopräparates verzichtet. Der statistische Vergleich der Nebenwirkungen erfolgte sowohl innerhalb der Therapiegruppe, als auch zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Zur statistischen Auswertung der Effektivität wurde eine Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche anhand des Log-Rang-Tests durchgeführt.

Insgesamt wurden 34 Katzen mit der immunstimulierenden Gentherapie behandelt und in ambulanten Kontrolluntersuchungen auf Nebenwirkungen und Rezidive untersucht. Hierbei wurden meist nur milde Nebenwirkungen festgestellt, die die Unbedenklichkeit der Therapie bestätigen konnten. Im Verlauf des Beobachtungsjahres wiesen 41 % der therapierten Katzen ein Lokalrezidiv auf, in der Kontrollgruppe hingegen waren es 65 %. Zwar wurde mit einem p-Wert von 0,072 beim Log-Rang-Test aufgrund der kleinen Gruppengrößen eine statistische Signifikanz knapp verfehlt, doch lässt das Ergebnis eine deutliche Tendenz in Richtung Wirksamkeit erkennen.

VII. SUMMARY

The feline fibrosarcoma is one of the most common and most malignant tumors in the veterinary clinical praxis. After the sole surgical removal of the tumor up to 70 % of the cats develop local recurrences. Adjuvant radiotherapy can noticeably improve the recurrence rate, but the application is labour-intensive and expensive. In the present prospective phase II trial the approach of a neo-adjuvant immunostimulatory gene therapy was pursued. To achieve transfection with the feline cytokine gene GM-CSF, a nonviral gene transfer via magnetofection was used. After noting only mild side effects in the preceding phase I trial in the highest dose group, 1250 µg GM-CSF could be defined as maximum tolerated dose for the following trial. On the one hand the present work should verify the harmlessness of the immunostimulatory gene therapy, on the other hand its efficiency should be proved.

Patients that matched defined inclusion criteria were treated twice with the immunostimulatory gene therapy. Therefore plasmids were mixed in aqueous solutions at 1:1 ratios with magnetic nanoparticles and injected intratumorally with a total volume of 500 µl. Afterwards a magnetic gradient field was applied to the tumor for 1h by tapping a neodymium-iron-boron magnet onto the tumor region. Thereby the transfection should be limited to the tumor region and the efficiency of the gene transfer should be improved. The treatment was conducted at days -14 and -7, the surgical tumor extirpation at day 1. Examinations regarding toxicity were conducted at days -7, 0, 14 and 45, examinations regarding developing local recurrences at days 14, 45, 90, 180, 270 and 360. Clinical and hematological toxicities that emerged were recorded according to a special toxicity scale (VCOG-CTCAE) and discussed regarding correlation to the conducted treatment. A control group of the same size was matched according to prognostic factors tumor size and recurrence out of "historical" control patients according to the treatment group and operated without receiving any adjuvant tumor therapy. For ethical reasons there were no leadtime and no applications of placebo for this group. Statistical comparisons regarding side effects were made within the treatment group and between the treatment and the control group. Survival analysis on the basis of log rank test was made to prove efficiency.

Altogether 34 cats were treated with the immunostimulatory gene therapy and tested for side effects and recurrences in ambulant examinations. At this only mild side effects were observed, that verified the harmlessness of the therapy. Within one year 41 % of the treated cats and 65 % of the control group developed local recurrences. With a p-value of 0.072 at the log rank test the statistical significance was curtly failed because of the small group sizes, but the result is a distinct tendency in the direction of efficiency.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Al-Homaidhi A, Prince HM, Al-Zahrani H, Doucette D, Keating A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-associated histiocytosis and capillary-leak syndrome following autologous bone marrow transplantation: two case reports and a review of the literature. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 209-14.

Alexiou C, Jurgons R, Seliger C, Brunke O, Iro H, Odenbach S. Delivery of superparamagnetic nanoparticles for local chemotherapy after intraarterial infusion and magnetic drug targeting. *Anticancer Res* 2007; 27: 2019-22.

Argyle DJ. Gene therapy in veterinary medicine. *Vet Rec* 1999; 144: 369-76.

Armitage JO. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; 92: 4491-508.

Armstrong AC, Hawkins RE. Vaccines in oncology: background and clinical potential. *Br J Radiol* 2001; 74: 991-1002.

Banerji N, Kanjilal S. Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *Am J Vet Res* 2006; 67: 1766-72.

Banerji N, Kapur V, Kanjilal S. Association of germ-line polymorphisms in the feline p53 gene with genetic predisposition to vaccine-associated feline sarcoma. *J Hered* 2007; 98: 421-7.

Barber LG, Sorenmo KU, Cronin KL, Shofer FS. Combined doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy for nonresectable feline fibrosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 2000; 36: 416-21.

Baxevanis CN, Dedoussis GV, Papadopoulos NG, Missitzis I, Beroukas C, Stathopoulos GP, Papamichail M. Enhanced human lymphokine-activated killer cell function after brief exposure to granulocyte-macrophage-colony stimulating factor. *Cancer* 1995; 76: 1253-60.

Bergman PJ. Biologic response modification. In: *Veterinary Oncology Secrets*, 1 edn. Rosenthal RC, ed. Philadelphia: Hanley & Belfus 2001: 79-82.

Bergman PJ. Cancer immunotherapy. *Top Companion Anim Med* 2009; 24: 130-6.

Betts G, Twohig J, Van den Broek M, Sierro S, Godkin A, Gallimore A. The impact of regulatory T cells on carcinogen-induced sarcogenesis. *Br J Cancer* 2007; 96: 1849-54.

Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 2004; 305: 200-5.

Bostock DE, Dye MT. Prognosis after surgical excision of fibrosarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1979; 175: 727-8.

Bregazzi VS, LaRue SM, McNiel E, Macy DW, Dernel WS, Powers BE, Withrow SJ. Treatment with a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine-associated sarcomas: 25 cases (1995-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 547-50.

Buchsel PC, Forgey A, Grape FB, Hamann SS. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: current practice and novel approaches. *Clin J Oncol Nurs* 2002; 6: 198-205.

Buracco P, Martano M, Morello E, Ratto A. Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat. *Vet J* 2002; 163: 105-7.

Burnet M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J* 1957; 1: 841-7.

Burton G, Mason KV. Do postvaccinal sarcomas occur in Australian cats? *Aust Vet J* 1997; 75: 102-6.

Cerruti F, Martano M, Petterino C, Bollo E, Morello E, Bruno R, Buracco P, Cascio P. Enhanced expression of interferon-gamma-induced antigen-processing machinery components in a spontaneously occurring cancer. *Neoplasia* 2007; 9: 960-9.

Cohen M, Wright JC, Brawner WR, Smith AN, Henderson R, Behrend EN. Use of surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine-associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219: 1582-9.

Costello RT, Gastaut JA, Olive D. Tumor escape from immune surveillance. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1999; 47: 83-8.

Couto CG, Macy DW. Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 1426-7.

Couto SS, Griffey SM, Duarte PC, Madewell BR. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. *Vet Pathol* 2002; 39: 33-41.

Coyne MJ, Reeves NC, Rosen DK. Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210: 249-51.

Cronin K, Page RL, Spodnick G, Dodge R, Hardie EN, Price GS, Ruslander D, Thrall DE. Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 1998; 39: 51-6.

Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2007; 117: 1167-74.

Daly MK, Saba CF, Crochik SS, Howerth EW, Kosarek CE, Cornell KK, Roberts RE, Northrup NC. Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 202-5.

Davis KM, Hardie EM, Martin FR, Zhu J, Brownie C. Correlation between perioperative factors and successful outcome in fibrosarcoma resection in cats. *Vet Rec* 2007a; 161: 199-200.

Davis KM, Hardie EM, Lascelles BD, Hansen B. Feline fibrosarcoma: perioperative management. *Compend Contin Educ Vet* 2007b; 29: 712-4, 6-20, 22-9 passim.

Day MJ, Schoon HA, Magnol JP, Saik J, Devauchelle P, Truyen U, Gruffydd-Jones TJ, Cozette V, Jas D, Poulet H, Pollmeier M, Thibault JC. A kinetic study of histopathological changes in the subcutis of cats injected with non-adjuvanted and adjuvanted multi-component vaccines. *Vaccine* 2007; 25: 4073-84.

De Man MM, Ducatelle RV. Bilateral subcutaneous fibrosarcomas in a cat following feline parvo-, herpes- and calicivirus vaccination. *J Feline Med Surg* 2007; 9: 432-4.

Deim Z, Palmi N, Cserni G. Feline vaccine-associated fibrosarcoma induced by aluminium compound in two cats: short communication. *Acta Vet Hung* 2008; 56: 111-6.

Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW, Janovitz EB. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J Comp Pathol* 1996; 114: 165-74.

Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 1997; 88: 801-10.

Dow SW, Elmslie RE, Willson AP, Roche L, Gorman C, Potter TA. In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma. *J Clin Invest* 1998; 101: 2406-14.

Dubielzig RR, Everitt J, Shaddock JA, Albert DM. Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. *Vet Pathol* 1990; 27: 62-5.

Dubielzig RR, Hawkins KL, Miller PE. Myofibroblastic sarcoma originating at the site of rabies vaccination in a cat. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 637-8.

Dunham SP, Bruce J. Isolation, expression and bioactivity of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Gene* 2004; 332: 97-106.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-8.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 329-60.

Dyer F, Spagnuolo-Weaver M, Cooles S, Tait A. Suspected adverse reactions, 2006. *Vet Rec* 2007; 160: 748-50.

Eckstein C, Guscetti F, Roos M, Martin de las Mulas J, Kaser-Hotz B, Rohrer Bley C. A retrospective analysis of radiation therapy for the treatment of feline vaccine-associated sarcoma. *Vet Comp Oncol* 2009; 7: 54-68.

Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909; 5: 273-90.

El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* 2004; 94: 1-14.

Ellis JA, Jackson ML, Bartsch RC, McGill LG, Martin KM, Trask BR, Haines DM. Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 209: 767-71.

Elmslie RE, Dow SW. Genetic immunotherapy for cancer. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1997; 12: 193-205.

Emminger W, Emminger-Schmidmeier W, Peters C, Susani M, Hawliczek R, Hocker P, Gadner H. Capillary leak syndrome during low dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rh GM-CSF) treatment of a patient in a continuous febrile state. *Blut* 1990; 61: 219-21.

Esplin DG, McGill LD, Meininger AC, Wilson SR. Postvaccination sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 202: 1245-7.

Esplin DG, Jaffe MH, McGill LD. Metastasizing Liposarcoma Associated With a Vaccination Site in a Cat. *Feline Practice* 1996; 24: 20-3.

Esplin DG, Bigelow M, McGill LD. Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat. *Vet Cancer Soc Newsletter* 1999; 23: 8-9.

Fischer HG, Frosch S, Reske K, Reske-Kunz AB. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. *J Immunol* 1988; 141: 3882-8.

Foss FM. Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol* 2002; 29: 5-11.

Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, Zhang Z, Yang H, Zhang H, Zhou C, Yao J, Jin L, Wang H, Yang Y, Fu YX, Wang FS. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 2007; 132: 2328-39.

Gagnon A. Drug injection-associated fibrosarcoma in a cat. *Feline Practice* 2000; 28: 18-21.

Gardlik R, Palffy R, Hodosy J, Lukacs J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* 2005; 11: RA110-21.

Gersting SW, Schillinger U, Lausier J, Nicklaus P, Rudolph C, Plank C, Reinhardt D, Rosenecker J. Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection. *J Gene Med* 2004; 6: 913-22.

Giudice C, Stefanello D, Sala M, Cantatore M, Russo F, Romussi S, Travetti O, Giancamillo MD, Grieco V. Feline injection-site sarcoma: Recurrence, tumour grading and surgical margin status evaluated using the three-dimensional histological technique. *Vet J* 2009;

Gobar GM, Kass PH. World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220: 1477-82.

Goverdhana S, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, Curtin JF, Soffer EB, Mondkar S, King GD, Hu J, Sciascia SA, Candolfi M, Greengold DS, Lowenstein PR, Castro MG. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther* 2005; 12: 189-211.

Graziano DF, Finn OJ. Tumor antigens and tumor antigen discovery. *Cancer Treat Res* 2005; 123: 89-111.

Grösslinger K, Alton K, Lorinson D. Histologische Bestimmung der Tumorgrenzen und Evaluierung der Rezidivrate beim feline vakzine-induzierten Fibrosarkom. *Kleintierpraxis* 2003; 48: 245-316.

Haddad JL, Goldschmidt MH, Patel RT. Fibrosarcoma arising at the site of a retained surgical sponge in a cat. *Vet Clin Pathol* 2010;

Hahn KA, Endicott MM, King GK, Harris-King FD. Evaluation of radiotherapy alone or in combination with doxorubicin chemotherapy for the treatment of cats

with incompletely excised soft tissue sarcomas: 71 cases (1989-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231: 742-5.

Hampel V, Schwarz B, Kempf C, Kostlin R, Schillinger U, Kuchenhoff H, Fenske N, Brill T, Hirschberger J. Adjuvant immunotherapy of feline fibrosarcoma with recombinant feline interferon-omega. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1340-6.

Hendrick MJ, Goldschmidt MH. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 968.

Hendrick MJ, Dunagan CA. Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988-1989). *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198: 304-5.

Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, Wang YY, Somlyo AP. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Res* 1992; 52: 5391-4.

Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, Haviland JC, Schelling SH, Engler SJ, Gliatto JM. Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). *J Am Vet Med Assoc* 1994; 205: 1425-9.

Hendrick MJ, Brooks JJ. Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Vet Pathol* 1994; 31: 126-9.

Hendrick MJ. Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 1425-6.

Hendrick MJ. Feline vaccine-associated sarcomas. *Cancer Invest* 1999; 17: 273-7.

Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, Shofer FS, Vail DM. Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996).

J Am Vet Med Assoc 2000; 216: 58-61.

Hershey AE, Dubielzig RR, Padilla ML, Helfand SC. Aberrant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis. *Vet Pathol* 2005; 42: 805-11.

Hirschberger J, Kessler M. Das feline Fibrosarkom. *Tierärztliche Praxis* 2001; 29: 66-71.

Hirschberger J, Huttlinger C. Feline Injection-Site Sarcoma. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7 edn. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. St. Louis: Saunders Elsevier 2010: 2199-202.

Horzinek MC. Fibrosarkome bei Katzen am Injektionsort - eine Stellungnahme. *Kleintierpraxis* 2001; 46: 661-3.

Horzinek MC. Fibrosarkome bei Katzen am Injektionsort - eine Stellungnahme (II). *Kleintierpraxis* 2006; 51: 453-6.

Hubel K, Dale DC, Liles WC. Therapeutic use of cytokines to modulate phagocyte function for the treatment of infectious diseases: current status of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma. *J Infect Dis* 2002; 185: 1490-501.

Huber PE, Pfisterer P. In vitro and in vivo transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. *Gene Ther* 2000; 7: 1516-25.

Huth S, Lausier J, Gersting SW, Rudolph C, Plank C, Welsch U, Rosenecker J. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med* 2004; 6: 923-36.

Huttinger C, Hirschberger J, Jahnke A, Kostlin R, Brill T, Plank C, Kuchenhoff H, Krieger S, Schillinger U. Neoadjuvant gene delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: a phase I trial. *J Gene Med* 2008; 10: 655-67.

Jacobs JJ, Sparendam D, Den Otter W. Local interleukin 2 therapy is most effective against cancer when injected intratumorally. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 647-54.

Jahnke A, Hirschberger J, Fischer C, Brill T, Kostlin R, Plank C, Kuchenhoff H, Krieger S, Kamenica K, Schillinger U. Intra-tumoral gene delivery of feIL-2, feIFN-gamma and feGM-CSF using magnetofection as a neoadjuvant treatment option for feline fibrosarcomas: a phase-I study. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2007; 54: 599-606.

Jain TK, Reddy MK, Morales MA, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol Pharm* 2008; 5: 316-27.

Jourdier TM, Moste C, Bonnet MC, Delisle F, Tafani JP, Devauchelle P, Tartaglia J, Moingeon P. Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene Ther* 2003; 10: 2126-32.

Kaaden O-R. Viruskrankheiten der Tiere. In: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 7 edn. Rolle M, Mayr A, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2002: 335.

Kalat M, Mayr B, Schleger W, Wagner B, Reifinger M. Chromosomal hyperdiploidy in a feline sarcoma. *Res Vet Sci* 1991; 51: 227-8.

Kamenica K, Brill T, Hirschberger J, Köstlin R, Hermanns W. Vakzineassoziierte feline Fibrosarkome: histopathologische Befunde und Prognose *Tierärztliche Praxis* 2008; 2: 127-34.

Karre K. Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol* 2008; 9: 477-80.

Kass PH, Barnes WG, Jr., Spangler WL, Chomel BB, Culbertson MR. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 396-405.

Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, McGill LD, Esplin DG, Lester S, Slater M, Meyer EK, Boucher F, Peters EM, Gobar GG, Htoo T, Decile K. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223: 1283-92.

Katayama R, Huelsmeyer MK, Marr AK, Kurzman ID, Thamm DH, Vail DM. Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54: 25-33.

Kempf C (2005) Nonviraler Gentransfer der feline Zytokin-Gene IL-2, IFN-gamma und GM-CSF als adjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze. Eine klinische Phase-I-Studie (Diss. med. vet.). Ludwig-Maximilians-Universität, München

Kent ME. Use of Immunostimulant as an Aid in Treatment and Management of Fibrosarcoma in Three Cats. *Feline Practice* 1993; 21: 13-7.

Kessler M. Tumoren der Haut. In: *Kleintieronkologie*, 2 edn. Kessler M, ed. Stuttgart: Parey in MSV Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG 2005: 196-236.

Kidney BA, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. *Am J Vet Res* 2000; 61: 1037-41.

Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, Burnham ML, Teifke JP, Czerwinski G, Jackson ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen. *Am J Vet Res* 2001a; 62: 833-9.

Kidney BA, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML. Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2001b; 62: 1990-4.

Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, Burnham M, Jackson ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for polyomavirus DNA and antigen. *Am J Vet Res* 2001c; 62: 828-32.

Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, Burnham ML, Jackson ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from feline vaccine site-associated sarcomas for feline foamy virus DNA. *Am J Vet Res* 2002; 63: 60-3.

King GK, Yates KM, Greenlee PG, Pierce KR, Ford CR, McAnalley BH, Tizard IR. The effect of Acemannan Immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995; 31: 439-47.

King GK, Harris DF, Hottinger H, Freeman KP, Hahn KA. Prolonged remission and survival time in cats with injection-site associated sarcomas using a pre-operative radiation and doxorubicin protocol: 61 cases (1988-2000). *Vet Radiol and Ultrasound* 2001; 42: 585.

Kirpensteijn J. Feline injection site-associated sarcoma: Is it a reason to critically evaluate our vaccination policies? *Vet Microbiol* 2006; 117: 59-65.

Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 44: 143-61.

Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, Page RL, Price GS, Williams LE, Hardie EM, Mathews KG, Thrall DE. Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2002; 43: 473-9.

Kraft W, Dürr UM, K. H (2003) *Katzenkrankheiten*, 5 edn. M. & H. Schaper, Alfeld/Hannover

Krotz F, de Wit C, Sohn HY, Zahler S, Gloe T, Pohl U, Plank C. Magnetofection-
-a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther* 2003; 7: 700-10.

Kudo-Saito C, Schlom J, Hodge JW. Intratumoral vaccination and diversified subcutaneous/ intratumoral vaccination with recombinant poxviruses encoding a tumor antigen and multiple costimulatory molecules. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1090-9.

Kuntz CA, Dernel WS, Powers BE, Devitt C, Straw RC, Withrow SJ. Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue sarcomas in dogs: 75 cases (1986-1996). *J Am Vet Med Assoc* 1997; 211: 1147-51.

Lachowicz JL, Post GS, Brodsky E. A phase I clinical trial evaluating imatinib mesylate (Gleevec) in tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 860-4.

Lester S, Clemett T, Burt A. Vaccine site-associated sarcomas in cats: clinical experience and a laboratory review (1982-1993). *J Am Anim Hosp Assoc* 1996; 32: 91-5.

Levine DB. The Hospital for the Ruptured and Crippled: William Bradley Coley, Third Surgeon-in-Chief 1925-1933. *HSS J* 2008; 4: 1-9.

Macy DW, Bergmann PJ. Vaccine-associated sarcomas in cats. *Feline practice* 1995; 23: 629-36.

Macy DW, Hendrick MJ. The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1996; 26: 103-9.

Madewell BR, Griffey SM, McEntee MC, Leppert VJ, Munn RJ. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999). *Vet Pathol* 2001; 38: 196-202.

Martano M, Morello E, Ughetto M, Iussich S, Petterino C, Cascio P, Buracco P. Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. *Vet J* 2005; 170: 84-90.

Mayer MN, Treuil PL, LaRue SM. Radiotherapy and surgery for feline soft tissue sarcoma. *Vet Radiol Ultrasound* 2009; 50: 669-72.

Mayr B, Eschborn U, Kalat M. Near triploidy in a feline fibrosarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A* 1991; 38: 617-20.

Mayr B, Hofstadler E, Schleger W, Reifinger M, Eisenmenger E. Trisomy D1, marker F1: new cytogenetic findings in two cases of feline fibrosarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A* 1994; 41: 197-201.

Mayr B, Schaffner G, Kurzbauer R, Schneider A, Reifinger M, Loupal G. Mutations in tumour suppressor gene p53 in two feline fibrosarcomas. *Br Vet J* 1995; 151: 707-13.

Mayr B, Bockstahler B, Loupal G, Reifinger M, Schleger W. Cytogenetic variation between four cases of feline fibrosarcoma. *Res Vet Sci* 1996; 61: 268-70.

Mayr B, Reifinger M, Alton K, Schaffner G. Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. *Vet Res Commun* 1998; 22: 249-55.

Mayr B, Blauensteiner J, Edlinger A, Reifinger M, Alton K, Schaffner G, Brem G. Presence of p53 mutations in feline neoplasms. *Res Vet Sci* 2000; 68: 63-70.

McEntee MC. The utility of contrast enhanced computed tomography in feline vaccine associated sarcomas. *Vet Radiol Ultrasound* 2000; 41: 575.

McEntee MC, Page RL. Feline vaccine-associated sarcomas. *J Vet Intern Med* 2001; 15: 176-82.

McNiel EA. Vaccine-associated sarcomas in cats: a unique cancer model. *Clin Orthop Relat Res* 2001: 21-7.

Miles BJ, Shalev M, Aguilar-Cordova E, Timme TL, Lee HM, Yang G, Adler HL, Kerns K, Pramudji CK, Satoh T, Gdor Y, Ren C, Ayala G, Wheeler TM, Butler EB, Kadmon D, Thompson TC. Prostate-specific antigen response and systemic T cell activation after in situ gene therapy in prostate cancer patients failing radiotherapy. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 1955-67.

Mir LM, Devauchelle P, Quintin-Colonna F, Delisle F, Doliger S, Fradelizi D, Belehradek J, Jr., Orłowski S. First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1997; 76: 1617-22.

Müller-Heidelberg M (2003) Immunologisches Monitoring der Genterapie des Fibrosarkoms der Katze, Zytokinetik und humorale Antwort auf Vektor und Transgen (Diss. med. vet.). Ludwig-Maximilians-Universität, München

Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in immune suppression and cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7: 31-40.

Nambiar PR, Haines DM, Ellis JA, Kidney BA, Jackson ML. Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2000; 61: 1277-81.

Nambiar PR, Jackson ML, Ellis JA, Chelack BJ, Kidney BA, Haines DM. Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas. *Vet Pathol* 2001; 38: 236-8.

Nieto A, Sanchez MA, Martinez E, Rollan E. Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor-alpha in feline vaccine-associated sarcomas. *Vet Pathol* 2003; 40: 651-8.

Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 2002; 9: 1647-52.

O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. Fas counter-attack--the best form of tumor defense? *Nat Med* 1999; 5: 267-8.

Ogilvie GK. Recent advances in the treatment of vaccine-associated sarcomas. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2001; 31: 525-33, vi-vii.

Pakravan N, Hassan AT, Hassan ZM. Naturally occurring self-reactive CD4+CD25+ regulatory T cells: universal immune code. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 197-201.

Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 588-94.

Petri-Fink A, Hofmann H. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): from synthesis to in vivo studies--a summary of the synthesis, characterization, in vitro, and in vivo investigations of SPIONs with particular focus on surface and colloidal properties. *IEEE Trans Nanobioscience* 2007; 6: 289-97.

Petterino C, Martano M, Cascio P, Cerruti F, Martini M, Morello E, Bruno R, Castagnaro M, Buracco P. Immunohistochemical study of STAT3 expression in feline injection-site fibrosarcomas. *J Comp Pathol* 2006; 134: 91-100.

Plank C, Schillinger U, Scherer F, Bergemann C, Remy JS, Krotz F, Anton M, Lausier J, Rosenecker J. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* 2003; 384: 737-47.

Poirier VJ, Thamm DH, Kurzman ID, Jeglum KA, Chun R, Obradovich JE, O'Brien M, Fred RM, 3rd, Phillips BS, Vail DM. Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 726-31.

Quintin-Colonna F, Devauchelle P, Fradelizi D, Mourot B, Faure T, Kourilsky P, Roth C, Mehtali M. Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther* 1996; 3: 1104-12.

Rassnick KM, Rodriguez CO, Khanna C, Rosenberg MP, Kristal O, Chaffin K, Page RL. Results of a phase II clinical trial on the use of ifosfamide for treatment of cats with vaccine-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2006; 67: 517-23.

Ribas A, Butterfield LH, Economou JS. Genetic immunotherapy for cancer. *Oncologist* 2000; 5: 87-98.

Rini BI, Weinberg V, Bok R, Small EJ. Prostate-specific antigen kinetics as a measure of the biologic effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with serologic progression of prostate cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 99-105.

Roithmaier S, Haydon AM, Loi S, Esmore D, Griffiths A, Bergin P, Williams TJ, Schwarz MA. Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26: 845-9.

Romanelli G, Marconato L, Olivero D, Massari F, Zini E. Analysis of prognostic factors associated with injection-site sarcomas in cats: 57 cases (2001-2007). *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232: 1193-9.

Sandler I, Teeger M, Best S. Metastatic vaccine associated fibrosarcoma in a 10-year-old cat. *Can Vet J* 1997; 38: 374.

Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kruger A, Gansbacher B, Plank C. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2002; 9: 102-9.

Schwarz B, Kempf T, Schillinger U, Brill T, Plank C, Köstlin R, Gansbacher B, Hirschberger J. Klonieren der feline Zytokin-Gene IL-2, IFN-gamma und GM-CSF zum adjuvanten, nonviralen gentherapeutischen Einsatz beim Fibrosarkom der Katze. *Kleintierpraxis* 2007; 52: 569-78.

Seguin B. Feline injection site sarcomas. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2002; 32: 983-95, viii.

Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res* 2004; 64: 6337-43.

Shaw SC, Kent MS, Gordon IK, Collins CJ, Greasby TA, Beckett LA, Hammond GM, Skorupski KA. Temporal changes in characteristics of injection-site sarcomas in cats: 392 cases (1990-2006). *J Am Vet Med Assoc* 2009; 234: 376-80.

Siddiqui F, Li CY, Larue SM, Poulson JM, Avery PR, Pruitt AF, Zhang X, Ullrich RL, Thrall DE, Dewhirst MW, Hauck ML. A phase I trial of hyperthermia-induced interleukin-12 gene therapy in spontaneously arising feline soft tissue sarcomas. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 380-9.

Somiari S, Glasspool-Malone J, Drabick JJ, Gilbert RA, Heller R, Jaroszeski MJ, Malone RW. Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther* 2000; 2: 178-87.

Sorensen KC, Kitchell BE, Schaeffer DJ, Mardis PE. Expression of matrix metalloproteinases in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2004; 65: 373-9.

Spugnini EP, Baldi A, Vincenzi B, Bongiorni F, Bellelli C, Citro G, Porrello A. Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: a preliminary study in a spontaneous feline model. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59: 375-81.

Steger-Lieb A, Kostorz A, Hauser B, Sumova A, Kaser-Hotz B. Einsatz der Strahlentherapie beim vakzineassoziierten Sarkom der Katze, Erfahrung aus 18 Fällen. *Tierärztliche Praxis* 2002; 30: 35-40.

Stern AC, Jones TC. The side-effect profile of GM-CSF. *Infection* 1992; 20 Suppl 2: S124-7.

Stiglmaier-Herb MT. Die Fibrosarkome der Katze unter besonderer Berücksichtigung ihrer Dignität. *Kleintierpraxis* 1987; 32: 45-92.

Sun WH, Burkholder JK, Sun J, Culp J, Turner J, Lu XG, Pugh TD, Ershler WB, Yang NS. In vivo cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2889-93.

Teicher BA. Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6247-51.

Thomas L (1959) *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. Hoeber-Harper, New York

Tizard IR (2004) *Veterinary Immunology: An Introduction*, 7 edn. Elsevier Health Sciences, Philadelphia

VAFSTF. Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force guidelines. Diagnosis

and treatment of suspected sarcomas. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 214: 1745.

Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest* 2000; 18: 781-92.

van Seventer GA, Shimizu Y, Shaw S. Roles of multiple accessory molecules in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 294-303.

VCOG. 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. *Vet Comp Oncol* 2004; 2: 195-213.

Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 711-38.

Wei W, Xu C, Wu H. Use of PEI-coated magnetic iron oxide nanoparticles as gene vectors. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004; 24: 618-20.

Weiner LM. Cancer immunotherapy--the endgame begins. *N Engl J Med* 2008; 358: 2664-5.

Wiedmann K (2005) Klinische Phase-I-Studie zur neoadjuvanten immunstimulierenden Therapie des felinen Fibrosarkoms mit Interleukin-2 und Interferon-gamma (Diss. med. vet.). Ludwig-Maximilians-Universität, München

Wieland S (2002) Klinische Phase-I-Studie zur genterapeutischen Immunstimulation durch Interleukin-2 und Interferon-gamma als adjuvante Behandlung des felinen Fibrosarkoms (Diss. med. vet.). Ludwig-Maximilians-Universität, München

Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 295-307.

IX. ANHANG

Anhang 1: Rundschreiben für Tierärzte



Hirschberger • Medizinische Kleintierklinik • Valentinstr. 13 • D-80539 München

ADRESSE

Juli 2007

Fibrosarkom-Gentherapie

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

mit erheblichen Neuerungen geht die Gentherapiestudie ununterbrochen weiter. Die Arbeitsgruppe hat die feline Zytokine Interleukin 2 (feIL-2), Granulozyten-Makrophagen-stimulierender-Faktor (feGM-CSF), Interferon γ (feIFN- γ) in Plasmide kloniert. Diese Plasmide werden präoperativ appliziert.

Wir verabreden mit dem Tierbesitzer einen Termin zur Aufnahmeuntersuchung, meist für den nächsten Dienstagmorgen. Es gibt keine Wartezeiten. Die Tiere bleiben zur OP 3 Tage stationär in der Tierklinik, Dienstag bis Donnerstag. Die Operation, die stationären Aufenthalte und sämtliche Kontrolluntersuchungen sind **kostenfrei**. Die Studie ist z.T. industriegefördert. Wir können Ihnen daher eine **Aufwandsentschädigung von € 75,-** für jede von Ihnen in die Studie eingebrachte Katze überweisen.

Kriterien für den Einstieg in die Gentherapiestudie

- Felines Fibrosarkom – Erstmanifestation, Verdacht **oder Rezidiv** –
- Lokalisation des Tumors am Rumpf (nicht Kopf oder Gliedmaßen)
- vollständige chirurgische Entfernung des Tumors möglich
- gutes Allgemeinbefinden
- keine Metastasen
- keine Kortikosteroide in den letzten 8 Wochen
- keine andere Krebskrankheit in der Anamnese

In der onkologischen Sprechstunde erfolgt keine Beratung, Diagnostik oder Therapie, die nicht direkt mit dieser Therapiestudie in Verbindung steht. Die Patienten werden für jede andere Beratung, Diagnostik oder prophylaktische Maßnahme wie z.B. Impfungen an Sie zurück überwiesen.

0177 xxxxxx	Cornelia Hüttlinger	(Doktorandin)
0172 xxxxxx	Florian Walsch	(Doktorand)
0174 xxxxxx	Prof. Dr. J. Hirschberger	
089/xxxxxxx	Büro	
www.fibrosarkom.de und info@fibrosarkom.de		

Prof. Dr. Johannes Hirschberger¹

Dipl. ECVIM-CA, hon. Dipl. ECVCP

Dr. Thomas Brill²

Prof. Dr. Roberto Köstlin¹

Dipl. ECVS

¹Tierärztliche Fakultät der LMU

Prof. Dr. Bernd Gänsbacher²

²Klinikum rechts der Isar der TU

Lehrstuhl für Innere Medizin
der kleinen Haustiere und Heimtiere
der Ludwig-Maximilians-Universität

Vorstand: Prof. Dr. Kathi Hartmann

Prof. Dr. Johannes Hirschberger
Valentinstr. 13
D-80539 München

www.medizinische-kleintierklinik.de
U-Bahn: Linie 3 und 6, Haltestelle "Universität"

Tele: +49 (89) 2180-2640
Fax: +49 (89) 2180-5913
hirschberger@lmu.de

Anhang 2: Informationsblatt für Tierbesitzer

I. Medizinische und Chirurgische Tierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität
Veterinärstraße 13
80539 München

Institut für Exp. Onkologie und Therapieforschung
der Technischen Universität
Ismaninger Straße 22
81675 München

***Informationsblatt zur Intratumoralen Immunstimulation mit
Interleukin-2-, Interferon γ und
Granulozyten-und-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem-Faktor
als Zusatztherapie in der veterinärmedizinischen Onkologie***

Sehr geehrte Katzenbesitzerin, sehr geehrter Katzenbesitzer,

Ihnen wurde angeboten, mit Ihrer Katze an einer klinischen Forschungsstudie teilzunehmen.

Was ist eine klinische Forschungsstudie?

Die Tierärzte der Universitätstierkliniken untersuchen die Entstehung und den Verlauf von Krankheiten und bemühen sich, verbesserte Methoden der Diagnostik und der Behandlung zu entwickeln. Dies nennt man klinische Forschung. Werden Patienten erstmals mit einer neu entwickelten Methode behandelt, bezeichnet man das als klinische Forschungsstudie. Die Teilnahme an einer klinischen Forschungsstudie ist grundsätzlich freiwillig.

Bevor Sie entscheiden, ob Sie mit Ihrer Katze an einer solchen klinischen Forschungsstudie teilnehmen wollen, müssen Sie sowohl die Vorteile als auch die Risiken kennen. Dieses Ihnen vorliegende Informationsblatt möchte Inhalt und Zweck der klinischen Forschungsstudie sowie Vor- und Nachteile für Ihre teilnehmende Katze möglichst genau darlegen. Sie haben weiterhin die Möglichkeit, mit dem Arzt, der Ihre Katze behandelt, ein ausführliches Beratungsgespräch zu führen.

Wenn Sie sich nach dieser Aufklärung und Beratung für die Teilnahme Ihrer Katze an der klinischen Forschungsstudie entscheiden, werden Sie gebeten, ein entsprechendes Formblatt (Einwilligungserklärung) zu unterschreiben. Sie erhalten dann eine Kopie dieser Erklärung, die Sie aufbewahren sollten.

Beschreibung der Studie

Die momentan übliche Methode der Behandlung von Fibrosarkomen bei Katzen (operative Entfernung des Tumors) hat sich als enttäuschend erwiesen. In bis zu 70% der Fälle rezidiert der Tumor, d. h. daß es nach einer gewissen Zeit zu einem erneuten Tumorwachstum an derselben Stelle kommt.

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß das Immunsystem eines Krebspatienten – Mensch oder Tier - fähig sein kann, gegen die Krebserkrankung zu kämpfen und selbst den Tumor zu zerstören. Deshalb werden Behandlungsformen geprüft, die auf eine Stärkung der körpereigenen Immunreaktion ausgerichtet sind.

In der hier beschriebenen Studie werden zur Stärkung der körpereigenen Immunreaktion spezielle Therapeutika verwendet, die aus gentechnisch verändertem Material hergestellt werden.

Beschreibung der wissenschaftlichen Vorgehensweise und der Verfahren

Die in dieser klinischen Studie verwendeten Therapeutika werden mithilfe rekombinanter Vektoren (Plasmide) hergestellt, die genetische Informationen für bestimmte Stoffe enthalten. Durch diese Plasmide, die als Transportmittel fungieren, werden die Gene in Körperzellen des Patienten eingeschleust, wo dann die Produktion körpereigener Botenstoffe erfolgt.

Mithilfe der Studie sollen Wirksamkeit und mögliche Nebenwirkungen dieser Therapeutika bewertet werden.

Eingebrachte genetische Information

Interleukin-2, Interferon γ und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor sind Eiweißstoffe, welche normalerweise von Zellen des Immunsystems gebildet werden und die körpereigene Immunreaktion anregen. Um die Produktion von Interleukin-2 und Interferon γ bzw. Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem-Faktor im Körper Ihrer Katze zu erhöhen, wird ihr eines der oben beschriebenen Therapeutika in den Tumor gespritzt. So soll das Immunsystem der Katze dazu angeregt werden, die nach der operativen Entfernung des sichtbaren Tumors möglicherweise verbliebenen Tumorzellen zu bekämpfen.

Interleukin-2:

In früheren Studien hat sich sowohl bei Hunden und Katzen als auch beim Menschen gezeigt, daß Interleukin-2 bei einigen Patienten in der Lage ist, die Größe oder die Anzahl von Tumoren zu verringern. Wurden in den früheren Studien Nebenwirkungen beobachtet, so war dies meist auf sehr hohe Dosen von Interleukin-2 zurückzuführen, die direkt in die Blutbahn gespritzt worden waren. (Auf Art und Schweregrad der Nebenwirkungen wird in einem gesonderten Abschnitt dieses Informationsblattes noch eingegangen.) Ihre Katze wird mit sehr geringen Mengen Interleukin-2 und nur örtlich (im Tumorgebiet) behandelt.

Interferon γ :

Interferon γ bewirkt eine Steigerung der körpereigenen unspezifischen Abwehr und zerstört entartete Zellen. Außerdem bremst es die Teilung von Zellen.

Bei der Verabreichung von Interferon γ als Arzneimittel wurden nur sehr geringe Nebenwirkungen beobachtet.

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor

Auch der Granulozyten-und-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor steigert die unspezifische körpereigene Abwehr und bewirkt eine Zerstörung entarteter Zellen.

Nach einer Injektion in die Blutbahn kam es in früheren Studien bei ca. 20 – 30 % der behandelten Patienten zu leichten Nebenwirkungen. Auch hiermit wird ihre Katze nur örtlich (im Tumorgebiet) behandelt.

Praktische Durchführung der Studie am Patienten**Injektionen**

Das gentechnisch behandelte Therapeutikum wird Ihrer Katze in den Tumor und das umliegende Gewebe gespritzt.

Kontrolltiere

Fünzig Prozent der Tiere werden nach einem mathematischen Schlüssel der sog. Kontrollgruppe zugeordnet. Diese Tiere erhalten keine Immunstimulation, sondern nur die übliche Standardtherapie (chirurgische Entfernung des Tumors) unter optimalen Bedingungen. Weder Sie noch die behandelnden Tierärzte wissen, welcher Gruppe Ihre Katze zugeordnet wurde. Die Beteiligten können jedoch nach Abschluß der Studie erfahren, ob Ihre Katze eine Zusatztherapie erhalten hat.

Operationen

Nachdem die Injektion mit dem neuartigen Gentherapeutikum erfolgt ist, wird der Tumor Ihrer Katze in der Chirurgischen Universitätstierklinik durch Herrn Professor Köstlin unter Vollnarkose entfernt. So erhält ihre Katze gegebenenfalls zunächst das zu prüfende Medikament und anschließend die bislang optimale Therapie.

Blutuntersuchungen

Vor und während der Therapie wird eine vollständige Blutuntersuchung durchgeführt. Auch bei den Nachkontrollen werden Blutuntersuchungen durchgeführt, um nachzuweisen, inwieweit das Immunsystem Ihrer Katze durch die Zusatztherapie aktiviert wurde.

Röntgendiagnostik

Vor der Therapie sollen Röntgenaufnahmen der Lunge zeigen, ob schon Tochtergeschwülste vorliegen.

Auch bei der abschließenden Kontrolle nach 12 Monaten werden die Lungen röntgenologisch auf Tochtergeschwülste untersucht.

Ultraschalluntersuchung

Mit einer Ultraschalluntersuchung des Bauchraumes vor der Therapie untersucht man die Bauchorgane auf Tochtergeschwülste. Auch diese Untersuchung wird bei der Abschlußuntersuchung nach 12 Monaten wiederholt.

Ärztliche Überwachung

In der Zeit der Studie wird der Gesundheitszustand Ihrer Katze intensiv von Ihrem behandelnden Tierarzt bzw. von den Tierärzten der Medizinischen Tierklinik überwacht.

Dazu ist es erforderlich, daß Sie mit Ihrer Katze
14, 45 und 90 Tage nach der Operation
und danach jeden dritten Monat (bis zum Ende des ersten Jahres)
zur tierärztlichen Nachkontrolle kommen.

Mit dieser engmaschigen Kontrolle soll der Operationserfolg, die Auswirkung der zusätzlichen Immunstimulation und die mögliche erneute Bildung von Tochtergeschwülsten bei Ihrer Katze frühzeitig erkannt werden.

Abbruch der Studie

Sollten sich erhebliche Nebenwirkungen zeigen, wird die klinische Studie zum Wohl Ihrer Katze abgebrochen. Werden bei ihrer Katze erneut Tumoren festgestellt, ist die Studie für ihre Katze ebenfalls beendet. In diesem Fall werden Ihnen entsprechend den klinischen Befunden Ihrer Katze andere verfügbare Therapiemöglichkeiten angeboten.

Ziele der Studie

Da es sich um ein neuartiges Behandlungsverfahren handelt, sollen mit der Studie Antworten zu folgenden Fragen gefunden werden:

Wirksamkeit:

Wie wirksam kann mit der Behandlung das Fibrosarkom Ihrer Katze eingedämmt werden – d. h. wird es gelingen, das Wiederauftreten des Tumors nach der chirurgischen Entfernung zu verhindern oder zumindest die Zeitspanne bis zum Wiederauftreten des Tumors zu verlängern?

Verträglichkeit:

Welche Art und welchen Schweregrad weisen die eventuell auftretenden Nebenwirkungen der Behandlung auf?

Nebenwirkungen

Wird eine neue Behandlungsmethode zum ersten Mal an einem Patienten angewandt, stellt sich stets auch die Frage nach möglichen Nebenwirkungen oder Komplikationen. Wir möchten ausdrücklich darauf hinweisen, daß die Sicherheit, das Wohl und die Genesung des Patienten in einer klinischen Forschungsstudie immer höchste Priorität haben!

Wenn hier von einer neuen Methode gesprochen wird, bedeutet dies nicht, daß keinerlei Erfahrungen damit vorliegen. Im Tiermodell Maus wurde bereits getestet, inwieweit sich Nebenwirkungen zeigen und vorhersagen lassen.

Folgende Nebenwirkungen können beim Einsatz der hier beschriebenen Immunstimulation zur Behandlung des Fibrosarkoms der Katze auftreten:

Fieber

Ein relativ großer Teil der Patienten zeigt nach dem Einsatz der Immunstimulation eine erhöhte Körpertemperatur. Der Normalbereich der Körpertemperatur der Katze liegt zwischen 38 und 39 °C. Bei sehr aufgeregtten Patienten kann in Einzelfällen auch eine Temperatur von bis zu 39,5 °C noch als normal angesehen werden. Der durch die Immunstimulation verursachte Anstieg der Körpertemperatur entspricht einem leichten Fieber und liegt somit nicht im lebensbedrohlichen Bereich.

Reduktion des Allgemeinbefindens und der Futteraufnahme

Ein Teil der Patienten zeigt im Anschluß an die Immunstimulation ein reduziertes Allgemeinbefinden, ist matt bis müde und frißt weniger. Dieser Zustand bessert sich aber schnell wieder.

Lokale Reaktionen

In früheren klinischen Studien, in denen ebenfalls Interleukin-2 und Interferon γ lokal verabreicht wurde, traten als Nebenwirkungen Hautrötungen und Schwellungen am Ort der Injektion auf.

Unwahrscheinliche Nebenwirkungen**Reaktionen des Gesamtorganismus**

Bei Gabe von sehr hohen Interleukin-2-Mengen direkt in die Blutbahn kam es sowohl beim Menschen als auch bei Tieren zu ernsthaften Komplikationen (wie Fieber, Erbrechen, Bluthochdruck und Schock). Bei Ihrer Katze wird nur im Bereich des Tumors die Produktion von Interleukin-2 gesteigert und kein Interleukin-2 direkt in die Blutbahn gespritzt. Heute weiß man auch, daß solche Nebenwirkungen nur von Konzentrationen hervorgerufen werden, die die für eine Immunstimulation benötigte Dosis um das 100- bis 1000fache übersteigen.

Allergische Reaktionen

Es zeigten sich bisher bei Verabreichung derselben Plasmidlösung, die auch in dieser klinischen Studie verwendet wird, bei Menschen und Versuchstieren keine allergischen Reaktionen nach der Injektion.

Unvorhersehbare Nebenwirkungen

Da die Immunstimulation ein Eingriff in einen lebenden Organismus ist, kann es immer zu unvorhersehbaren Nebenwirkungen kommen, ähnlich wie auch bei einer Narkose immer ein gewisses Restrisiko besteht.

Durch die aufmerksame Beobachtung Ihrer Katze und durch die intensive tierärztliche Kontrolle der Katzen sollten unbekannte Nebenwirkungen frühzeitig erkannt und, falls notwendig, entsprechend behandelt werden.

Weitere wichtige Hinweise**Kosten**

Kosten für die genterapeutische Behandlung, die tierärztlichen Verlaufsuntersuchungen, die stationären Aufenthalte in der Universitäts-Tierklinik und die oben angesprochenen Blut- und Röntgenuntersuchungen werden Ihnen nicht in Rechnung gestellt. Dafür erwarten wir von Ihnen, daß Sie mit Ihrer Katze lückenlos zu allen Kontrollterminen erscheinen. Sollten Sie persönlich die Entscheidung treffen, mit Ihrem Tier vorzeitig aus der Studie auszutreten, werden Ihnen die entstandenen Kosten entsprechend der tierärztlichen Gebührenordnung in Rechnung gestellt.

Vertraulichkeit

Die Forschungs- und Klinikberichte Ihrer Katze sind vertraulich. Weder Ihr Name noch der Name Ihrer Katze oder andere persönliche Informationen, die Ihre Identifizierung erlauben würden, werden in Berichten oder Veröffentlichungen über diese Studie verwendet.

Autopsie

Sollte Ihre Katze, ob durch Unfall oder durch eine Krankheit, ableben, auch dann, wenn diese nicht mit der Studie im Zusammenhang steht, werden Sie um die Zustimmung zu einer Autopsie ersucht werden. Selbstverständlich liegt die Entscheidung darüber bei Ihnen.

Recht auf Ablehnung der Teilnahme und Rücktritt von der Studie

Die Entscheidung zur Teilnahme oder Nichtteilnahme an der Studie liegt allein bei Ihnen. Um diese Entscheidung zu treffen, muß Ihnen die Studie vom Tierarzt erklärt werden und Sie müssen das, was Sie über die Studie oder andere mögliche Therapieformen erfahren haben, verstehen. Während der Zeit, in der Ihre Katze an der klinischen Studie teilnimmt, werden Sie über alle neuen Erkenntnisse informiert, die Ihre Bereitschaft zur weiteren Teilnahme an der Studie beeinflussen könnten. Wenn Sie sich entscheiden, nicht an der Studie teilzunehmen, steht Ihnen die Standardtherapie vorurteilsfrei zur Verfügung. Wenn Sie an der Studie teilnehmen, haben Sie jederzeit das Recht, von der Studie zurückzutreten. Sollten Sie zurücktreten, so werden Ihnen entsprechend dem medizinischen Befinden Ihrer Katze andere verfügbare Heilverfahren angeboten.

Anhang 3: Einverständniserklärung

I. Medizinische und Chirurgische Tierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität
Veterinärstraße 13
80539 München

Institut für Exp. Onkologie und Therapieforschung
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität
Ismaninger Straße 22
81675 München

***Interleukin2 , Interferon γ und
Granulozyten-und-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor-Gentherapie
als Zusatztherapie in der veterinärmedizinischen Onkologie***

**Einverständniserklärung des Patientenbesitzers
zur Teilnahme an einer klinischen Forschungsstudie nach vorheriger Aufklärung**

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Katze in die oben aufgeführte klinische Studie der Medizinischen Tierklinik der LMU München und des Institutes für Experimentelle Onkologie der TU München aufgenommen wird.

Ich bin mir darüber im Klaren, dass meine Katze an einem randomisierten Blindversuch teilnimmt.

Die Behandlungsmaßnahme, der mein Tier unterzogen wird, besteht aus der Behandlung mit gentechnisch behandeltem Material (Plasmide, in die therapeutische Gene eingebaut wurden) oder mit Placebo. Im Anschluss an diese Primärbehandlung erhält meine Katze die allgemein anerkannte Therapiemethode (operative Entfernung des Tumors). Die Gentherapie wird während der Studie als Zusatztherapie eingesetzt, um die Metastasenbildung und die Neubildung des Tumors zu hemmen.

Ich wurde sowohl über die potentiellen Risiken als auch über die Vorteile der Behandlung und Operationsrisiken aufgeklärt, habe sie verstanden und erkläre mich – unter Wahrung meiner Interessen – mit der Behandlung einverstanden.

Ich erkläre mich dazu bereit, mein Tier den Erfordernissen entsprechend zu Folgeuntersuchungen vorzustellen. Sollte der Patient zu einer Folgeuntersuchung nicht erscheinen, verpflichte ich mich zur Übernahme der Operations- und Behandlungskosten entsprechend der Gebührenordnung für Tierärzte.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift des Patientenbesitzers

.....
Name des Patientenbesitzers (Druckschrift)

.....
Ort, Datum

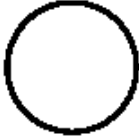
.....
Unterschrift des Tierarztes

.....
Name des Tierarztes (Druckschrift)

Anhang 4: Formblatt für d-14

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

Laufende Studien-Nummer Aufkleber



Untersuchung Tag -14 (Studienaufnahme) (Dienstag) Datum: _____

Überweisender praktischer Tierarzt:

Name: _____

Straße: _____ PLZ: _____ Ort: _____

Bank: _____ Kto.: _____ BLZ: _____

Rücküberweisung gefaxt:

Vorbericht des überweisenden praktischen Tierarztes bzw. des Besitzers:

Impfstatus: _____ Freilaufer: ja nein

Kopie des Impfausweises: ja nein

Klinische Untersuchung Tag -14

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____ Verhalten: _____

Ernährungszustand: _____ Pflegezustand: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp/ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Schilddrüse: _____

Sonstiges: _____

1

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Spezielle Untersuchung Tag -14

Tumorkalisation: _____

Tumorzahl: _____

TumorgroÙe
(LängeR1xBreiteR2xHöheR3): _____

Tumorzummen ((R1*R2*R3)* π)/6: _____

Tumorstaging ((R1+R2+R3)/3): I (< 2 cm) II (2-3 cm) III (>3cm oder multiple Tumoren)

Tumoreschaffenheit: _____

Operabilität: Consult Chirurg: nein ja, Beurteilung: _____CT nötig: nein ja, Kosten trägt _____, Einverständniserklärung **FNA** durch _____ Beurteilung: _____Rezidiv: ja, ____ . Rezidiv nein

Wann operiert? _____

Wer hat operiert? _____

Histo-/Zytobefund? _____

Weiterführende Untersuchungen/Labor Tag -14**Röntgen:**

Thorax l/l: _____

(li. u. re. anliegend) _____

Thorax v/d: _____

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Sonographie: (durchgeführt durch _____)
 Abdomen: _____

Labor: EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)
 Serum (AST, AP, Bilirubin, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc, evtl. Frukt, E-IgE, SGS, T4, FIV, FeLV)
 Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (-70 °C)

Einschlußkriterien in die Studie

Einverständnis des Besitzers? (klinische Studie, Operation, Nachuntersuchungen)? ja nein
 Lebenserwartung von über 1 Jahr abgesehen von der Tumorerkrankung? ja nein
 Tumor von klinischer Untersuchung ausgehend beurteilt in einer Sitzung operabel? ja nein
 Tumor am Rumpf lokalisiert? ja nein

Ausschlußkriterien aus der Studie

Eröffnung einer Körperhöhle oder Amputation einer Gliedmaße bei der Operation nötig ja nein
 Strahlen-, Chemo- oder Genterapie in der Vergangenheit? ja nein
 Behandlung mit Immunsuppressiva (z. B. Kortikosteroiden) in den letzten 6 Wochen? ja nein
 Hinweise auf Vorliegen von Metastasen des Fibrosarkoms? ja nein
 Hinweise auf anderen malignen Tumor zurzeit oder in der Anamnese? ja nein
 Katze trächtig? ja nein

1. Injektion feGM-CSF/3er-Kombi ja nein

Klinische Untersuchung nach Therapie Tag -14

Temperatur: _____
 Allgemeinbefinden: _____
 Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____
 HF: _____ Ausk.: _____
 Atmung (adsp/ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
 Abdomen: _____

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: Datum: _____ Kürzel: _____

Anhang 5: Formblatt für d-7

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Vorbericht Tag -14 bis Tag -7:

Untersuchung Tag -7 (Dienstag)

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag -7

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Ernährungszustand: _____ Pflegezustand: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp/ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Spezielle Untersuchung Tag -7

Tumorklassifikation: _____

Tumorzahl: _____

TumorgroÙe
(LängeR1xBreiteR2xHöheR3): _____Tumolvolumen $((R1 \cdot R2 \cdot R3) \cdot \pi) / 6$: _____Tumorstaging $((R1+R2+R3)/3)$: I (< 2 cm) II (2-3 cm) III (>3cm oder multiple Tumoren)

Tumorbeschaffenheit: _____

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

2. Injektion feGM-CSF/3er-Kombija
nein**Labor:**EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)
Serum (AST, AP, Bilirubin, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc, evtl. Frukt, E-Tyler, SGS, T4, FIV, FeLV)
Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (-70 °C)**Klinische Untersuchung nach Therapie Tag -7**

Temperatur: _____

Allgemeinbefinden: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: Datum:**Kürzel:**

Anhang 6: Formblatt für d180

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Vorbericht Tag 90 bis Tag 180:

Untersuchung Tag 180 (Dienstag)

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 180

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp/ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Spezielle Untersuchung Tag 180**Wundgebiet und Umgebung:**

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Rezidiv d 180

ja

nein

Wann aufgetreten? _____

Weiteres Vorgehen? _____

Nächster Nachuntersuchungstermin? _____

Weitere Maßnahmen? _____

Labor:

EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)

Serum (AST, AP, Bil, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc)

Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (- 70 °C)

Sonstige Untersuchungen

Anhang 7: Formblatt für d360

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Vorbericht Tag 270 bis Tag 360

Untersuchung Tag 360 (Dienstag)

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 360

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp/ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Spezielle Untersuchung Tag 360**Wundgebiet und Umgebung:**

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Rezidiv d 360 ja**nein**

Wann aufgetreten? _____

Weiteres Vorgehen? _____

Nachster Nachuntersuchungstermin? _____

Weitere Maßnahmen? _____

Labor:

EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)

Serum (AST, AP, Bil, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc)

Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (- 70 °C)

Röntgen:

Thorax l/l: _____

(re. u. li. anliegend) _____

Thorax v/d: _____

Sonographie:

Thorax v/d: _____

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: Datum:

Kürzel:

X. DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Hirschberger danke ich für die Möglichkeit zur Teilnahme an diesem interessanten Projekt, für die gute Betreuung, für seine unkomplizierte Hilfe bei Fragen und für die schnelle und ausführliche Korrektur der Doktorarbeit.

Besonderer Dank gilt meinen FSA-Kolleginnen Riki Schillinger, Conni Hüttinger, Anika Jahnke, Judith Haas, Danny Schiele, Steffi Daub und Mimi Rutz für die freundschaftliche und gute Zusammenarbeit. Es war eine große Freude in einem so harmonischen Team zu arbeiten.

Den Tierärzthelferinnen und Tierärzthelfern der Medizinischen Kleintierklinik München danke ich für die Hilfe und den Einsatz bei der Arbeit mit unseren Patienten. Vor allem gilt mein Dank Susi Stöckert für die liebevolle Betreuung unserer Patienten und die schöne gemeinsame Zeit an der Klinik.

Unseren Onko-Residents Isa Zenker und Tina Meichner danke ich für die Hilfe bei Fragen und der Untersuchung der zytologischen Präparate.

Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann möchte ich für die Unterstützung der gesamten Fibrosarkomstudie danken.

Mein Dank geht auch an das Team der Chirurgischen Tierklinik und ganz besonders an Herrn Prof. Dr. Roberto Köstlin für die wöchentliche Betreuung und Operation unserer Patienten.

Für die Beratung und geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung danke ich Frau Dr. Carola Sauter-Louis.

Ein großes Dankeschön auch den überweisenden Tierärztinnen und Tierärzten für die gute Zusammenarbeit und den Patientenbesitzern, die diese Studie durch ihr verlässliches Erscheinen zu den Kontrollterminen ermöglicht haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und vor allem meinen Eltern, die immer für mich da sind und mir mein Studium und vieles mehr in meinem Leben ermöglicht haben.

Auch bei meinen Freunden möchte ich mich bedanken, auf die ich immer verlassen kann. Vor allem danke ich hierbei Clemens Knobling und Nico für die Hilfe beim Layout und der Statistik.

Ganz besonders danke ich meinem Freund Marko Still für seine liebevolle Unterstützung und Geduld.

