

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. vet. med. Katrin Hartmann

Angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. med. vet. Johannes Hirschberger

Intratumoraler Transfer der felines Zytokin-Gene Il-2, IFN- γ und GM-CSF unter Verwendung der Magnetofektion als neoadjuvante Behandlung des felines Fibrosarkoms

Eine Phase-II-Studie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

München

von

Antje Hoeksma

aus Freiburg im Breisgau

München 2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Referent: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Deeg

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Das feline Fibrosarkom	3
1.1.	Ätiologie und Pathogenese.....	3
1.1.1.	Das injektionsassoziierte Fibrosarkom.....	3
1.1.2.	Das FeSV (feline Sarkomvirus)- induzierte Fibrosarkom.....	6
1.1.3.	Das intraokuläre posttraumatische Fibrosarkom.....	6
1.1.4.	Das Fibrosarkom anderer Ätiologie	7
1.2.	Inzidenz und Epidemiologie.....	7
1.3.	Das klinische Erscheinungsbild	8
1.4.	Das histologische Erscheinungsbild.....	9
1.5.	Therapiemöglichkeiten.....	10
1.5.1.	Chirurgie.....	10
1.5.2.	Radiotherapie	11
1.5.3.	Chemotherapie	12
1.5.4.	Immuntherapie	13
1.6.	Prognose	16
1.6.1.	Rezidivrate	17
1.6.2.	Metastasierungsrate	17
1.7.	Prävention.....	18
2.	Tumorimmunität.....	19
2.1.	Tumorantigene	19
2.2.	MHC-Komplex.....	20
2.3.	Effektorzellen der Tumorimmunität.....	21
2.3.1.	CD8+T-Lyphozyten	21
2.3.2.	CD4+-T-Lymphozyten.....	21
2.3.3.	Natürliche Killerzellen	22
2.3.4.	Antigenpräsentierende Zellen (APC).....	22
2.3.5.	Makrophagen.....	23
2.4.	Tumor-escape-Mechanismen	23

3.	Immuntherapie bei Tumoren.....	24
3.1.	Immunstimulierende Antitumor-Gentherapie.....	25
3.2.	Gentransfer.....	26
3.2.1.	Viraler Gentransfer.....	27
3.2.2.	Nonviraler Gentransfer.....	27
3.2.2.1.	Magnetofektion.....	28
3.3.	Zytokine.....	30
3.3.1.	Interleukin 2.....	30
3.3.2.	Interferon- γ	31
3.3.3.	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF).....	32
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	34
1.	Studiengrundlagen.....	34
1.1.	Aufbau der Studie.....	34
1.2.	Patientengut.....	34
1.3.	Ein- und Ausschlusskriterien.....	35
1.4.	Nachträgliche Ausschlusskriterien.....	36
2.	Studienablauf.....	37
2.1.	Zeitlicher Ablauf.....	37
2.2.	Aufnahmeuntersuchung.....	38
2.2.1.	Allgemeine Untersuchung.....	39
2.2.2.	Spezielle Untersuchung.....	39
2.2.3.	Röntgenuntersuchung.....	40
2.2.4.	Ultraschalluntersuchung.....	40
2.2.5.	Blutuntersuchung.....	40
2.3.	Intratumorale Injektion und Magnetofektion.....	41
2.4.	Operationsvorbereitung, Anästhesie und Medikamente.....	43
2.5.	Operation.....	44
2.6.	Zytologie und histopathologische Untersuchungen.....	45
2.7.	Nachsorge.....	45
2.8.	Kontrolluntersuchungen.....	46
2.9.	Abschlussuntersuchung.....	46

3.	Studienauswertung	47
3.1.	Auswahl der Kontrollgruppe	47
3.2.	Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe	47
3.3.	Auswertung der Nebenwirkungen	48
3.4.	Auswertung der Effektivität	49
IV.	ERGEBNISSE	50
1.	Stammdaten der Studientiere	50
2.	Stammdaten der historischen Kontrollgruppe	51
3.	Deskriptive Statistik	53
3.1.	Alter	53
3.2.	Gewicht	54
3.3.	Tumorlokalisierung	56
4.	Explorative Statistik	57
4.1.	Toxizität und Nebenwirkungen	57
4.1.1.	Blutbildveränderungen	60
4.1.1.1.	Hämoglobinabfall	60
4.1.1.2.	Hämatokritabfall	60
4.1.1.3.	Leukozytopenie	61
4.1.1.4.	Leukozytose	61
4.1.1.5.	Lymphozytopenie	62
4.1.1.6.	Lymphozytose	62
4.1.1.7.	Eosinophilie	63
4.1.1.8.	Basophilie	63
4.1.1.9.	Monozytose	64
4.1.1.10.	Stabkernige Neutrophilie	64
4.1.1.11.	Segmentkernige Neutrophilie	65
4.1.1.12.	Thrombozytenveränderungen	66
4.1.2.	Veränderungen im Serumprofil	66
4.1.2.1.	Erhöhung der Serum-Aspartat-Amino-Transferase-Aktivität	66
4.1.2.2.	Erhöhung der Kreatininkonzentration	67
4.1.2.3.	Erhöhung der Bilirubinkonzentration	68

4.1.2.4.	Erhöhung der Blutglukosekonzentration.....	68
4.1.3.	Anamnestische und klinisch fassbare Nebenwirkungen	69
4.1.3.1.	Allergische Reaktionen	69
4.1.3.2.	Anorexie	69
4.1.3.3.	Diarrhoe.....	70
4.1.3.4.	Dyspnoe.....	70
4.1.3.5.	Fieber.....	71
4.1.3.6.	Gewichtsverlust.....	71
4.1.3.7.	Konstipation	72
4.1.3.8.	Lethargie.....	72
4.1.3.9.	Vomitus	73
4.1.3.10.	Nichtinfizierte Wundheilungsstörungen	73
4.1.3.11.	Infizierte Wundheilungsstörungen	74
4.2.	Effektivität.....	75
4.2.1.	Übersicht der Therapiegruppe	75
4.2.2.	Übersicht der Kontrollgruppe.....	75
4.2.3.	„Überlebenszeitanalyse" der rezidivfreien Zeit	75
V.	DISKUSSION	77
1.	Das Fibrosarkom als Tumormodell.....	77
2.	Nonviraler Gentransfer.....	78
3.	Speziesspezifische Zytokine	78
4.	Der gleichzeitige Einsatz der drei feline Zytokingene	79
5.	Festlegung der Dosis	80
6.	Magnetofektion	81
7.	Nachweis der Genexpression	82
8.	Nebenwirkungen	83
9.	Effektivität.....	86
10.	Schlussbetrachtung.....	87

VI.	ZUSAMMENFASSUNG	89
VII.	SUMMARY.....	91
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	93
IX.	ANHANG	110
X.	DANKSAGUNG	126

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Antigen-präsentierende Zelle
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
fe	feline /-s
FeLV	Felines Leukosevirus
FeSV	Felines Sarkomvirus
FGF- β	<i>fibroblast growth factor-β</i>
FIV	felines Immundefizienz-Virus
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
hu	humane /-m
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
KGW	Körpergewicht
LAK	Lymphokin-aktivierte-Killerzellen
LGL	Large-granular-Lymphozyt
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MHC	Major histocompatibility Complex
MRFZ	Mittlere rezidivfreie Zeit
MTD	Maximal Tolerierbare Dosis
Nd-Fe-B-Magnet	Neodymuim-Eisen-Bor-Magnet
NKZ	Natürliche Killerzellen

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PEI	Polyethylenimin
RNA	Ribonukleinsäure
STAT 3	<i>signal transducers and activators of transcription 3</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- α	<i>transforming growth factor- α</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor- β</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor- α</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VAFSTF	Vaccine-associated Feline Sarcoma Task Force
VCOG-CTCAE	Veterinary Co-operative Oncology Group-Common Terminology Criteria for Adverse Events

I. EINLEITUNG

Nicht nur wegen seines hochmalignen Charakters und des plötzlich vermehrten Auftretens von feline Fibrosarkomen seit Anfang der neunziger Jahre in den USA, sondern auch wegen der Spärlichkeit an wirkungsvollen Therapieoptionen wird das feline Fibrosarkom nun schon seit längerer Zeit von Tierärzten und auch Tierbesitzern als ein ernstzunehmendes Problem angesehen. Unterschiedliche Therapiemodelle verfehlen die erwartete Effektivität, werden von Patientenbesitzern nicht ausreichend akzeptiert oder stellen sich unter Praxisbedingungen als nicht praktikabel heraus. Zudem kommt es in der tierärztlichen Praxis zunehmend zu Unstimmigkeiten zwischen Patientenbesitzern und Tierärzten, da das feline Fibrosarkom zu den Erkrankungen zählt, die durch eine tierärztliche Maßnahme verursacht werden können und demnach die iatrogene Komponente einen entscheidenden Stellenwert in der Tumorgenese einnimmt.

Das feline Fibrosarkom ist ein bösartiger bindegewebiger Tumor, der selbst bei radikalen Operationstechniken sehr hohe Lokalrezidivraten von bis zu 70% aufweist. Mit gängigen adjuvanten Therapieformen in Form von Radio- oder Chemotherapie können die Rezidivraten zwar auf bis zu 41% gesenkt werden, sie sind jedoch neben einem enormen logistischen und finanziellen Aufwand auch mit Nebenwirkungen verbunden, so dass sie von Seiten der Patientenbesitzer nur sehr schlecht angenommen werden.

Auf der Suche nach einer praxistauglichen und effektiven Therapiemöglichkeit wurden aus diesem Grund seit 1999 von der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung der Technischen Universität München im Rahmen des Projektes „Immunologische Gentherapie des feline Fibrosarkoms“ verschiedene Studien durchgeführt, die sich mit dem Einsatz von Zytokinen in der Krebstherapie beschäftigen.

In der vorliegenden Studie werden hierfür katzen-eigene Zytokine verwendet, deren Expression mit Hilfe der Methode der Magnetofektion optimiert werden soll. Durch die intratumorale Applikation und anschließende Expression der feline Zytokine soll das Immunsystem stimuliert werden, eine antitumorale

Wirkung zu entfalten.

In der vorausgegangenen Phase-I-Studie konnte bereits eine gut verträgliche Dosis von 450 µg/Plasmid festgelegt werden. Das Ziel dieser Phase-II-Studie ist es nun, bei einem größeren Patientenkollektiv möglicherweise auftretende Nebenwirkungen und Toxizitäten zu erfassen. Die im Verlauf der Therapie auftretenden Nebenwirkungen werden anhand eines Nebenwirkungskatalogs dokumentiert und ausgewertet. Anschließend werden sie in Korrelation mit der Therapie gesetzt. Ein weiteres Ziel dieser Studie liegt in der Ermittlung der Effektivität.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das feline Fibrosarkom

Das feline Fibrosarkom ist ein mesenchymaler Tumor und stellt mit bis zu 40% die mit Abstand häufigste kutane Neoplasie der Katze dar (JORGER, 1988, ORTMANN 1986, STIGLMAIR-HERB 1987). Mit seinem malignen Charakter kann dieser aus Bindegewebe bestehende, hoch infiltrativ wachsende Tumor aber auch in angrenzende Gewebe ziehen.

1.1. Ätiologie und Pathogenese

Aufgrund unterschiedlicher pathogenetischer Gesichtspunkte wird das feline FSA wie folgt unterteilt (HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001):

1. Das vakzine-assoziierte Fibrosarkom
2. Das feline Sarkomvirus (FeSV)-induzierte Fibrosarkom
3. Das intraokuläre posttraumatische Fibrosarkom
4. Das Fibrosarkom anderer Ätiologie

1.1.1 Das injektions-assoziierte Fibrosarkom

Durch eine Tollwutepidemie im Bundesstaat Pennsylvania, USA, Ende der 80er Jahre und einer darauf folgenden staatlich angeordneten Impfpflicht, erkennen die Pathologen HENDRICK und GOLDSCHMIDT einen vermeintlichen Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten von Fibrosarkomen bei der Katze (HENDRICK und GOLDSCHMIDT, 1991). Aufgrund von epidemiologischen Studien werden in dieser Zeit insbesondere die Impfstoffe gegen Tollwut und FeLV mit der Entstehung eines Fibrosarkoms in Verbindung gebracht (MACY, 1995, KASS et al., 1993, HENDRICK und BROOKS, 1994). Neben der FeLV- und der Tollwutvakzine werden zunehmend aber auch andere Impfstoffe gegen die Rhinotracheitis-, Calici- sowie Panleukopenie-Viren in Diskussion gestellt, ein Fibrosarkom auslösen zu können (LESTER et al.; 1996, BURTON und MASON, 1997, COYNE et al. 1997, DE MAN und DUCATELLE, 2007). 1992 können im

Zytoplasma von Makrophagen des peritumoralen Gebietes verschiedener Gewebeproben Aluminiumpartikel nachgewiesen werden (HENDRICK und BROOKS, 1994). Dies führte zu der Annahme, dass dieses Adjuvant, das Bestandteil vieler Impfstoffe ist, auch das auslösende Agens ist. Diese Vermutung konnte aber schon 1993 durch eine Studie von KASS und Mitarbeitern widerlegt werden. In dieser Studie wird gezeigt, dass auch Impfstoffe ohne Aluminium als Adjuvant oder Impfstoffe, die andere Adjuvantien als Aluminium enthalten, in der Lage sind, ein Fibrosarkom auszulösen (KASS et al., 1993). Vergleicht man allerdings die lokalen Entzündungsreaktionen von Impfstoffen, mit und ohne Adjuvantien, so lösen die Impfstoffe, die Adjuvantien enthalten, signifikant mehr Entzündungsanzeichen aus als Vakzine, die keine Adjuvantien beinhalten (DAY et al., 2007). Neben Impfstoffen kommen mit der Zeit aber auch immer mehr andere iatrogene Ursachen zur Entstehung eines Fibrosarkoms in Betracht. So werden mittlerweile auch Injektionen mit Langzeitantibiotika, Methylprednisolonacetat, Lufenuron sowie der lokalen Anwendung von Ektoparasitika, oder dem Verbleiben von chirurgischem, nicht resorbierbarem Nahtmaterial eine Rolle in der Tumorgenese zugesprochen (BURACCO et al., 2002, BURTON und MASON, 1997, ESPLIN, 1999, MACY und HENDRICK, 1996, COYNE et al., 1997, GAGNON, 2000, GOBAR und KASS, 2002, LESTER et al., 1996, MCENTEE und PAGE, 2001). 2008 wurde ein Fallbericht von DALY und Mitarbeitern veröffentlicht, in dem ein Mikrochipimplantat in Verdacht steht, ein Fibrosarkom verursacht zu haben (DALY et al., 2008). Nicht nur aus diesem Grund, sondern auch weil all diese iatrogen entstandenen Fibrosarkome auch histologische Ähnlichkeiten zeigen und aufgrund dessen von Fibrosarkomen anderer Genese klar abzugrenzen sind, wird heute von den meisten Autoren viel mehr vom injektions-assoziierten, statt vom vakzine-assoziierten Fibrosarkom gesprochen. Den iatrogenen Ursachen ist gemein, dass ein lokales Trauma in die Kutis, Subkutis oder die Muskulatur gesetzt wird. Man geht davon aus, dass das Immunsystem der Katze durch die somit verursachte Reizung übersteigert reagiert und zu einer andauernden, granulomatösen Entzündung führt. Dieser Reiz wiederum kann zu Proliferation mesenchymaler Zellen wie Fibroblasten und Myofibroblasten führen und ein Fibrosarkom entstehen lassen (HENDRICK et al., 1994, MACY und HENDRICK, 1996, HENDRICK 1998, McENTEE und PAGE, 2001). Diese pathogenetische Vermutung wird durch histopathologische Untersuchungen gestützt, die belegen,

dass ein Übergang zwischen granulomatösen Entzündungen und Sarkomen besteht (ESPLIN et al., 1993, HENDRICK und BROOKS, 1994, HENDRICK, 1999).

Neben den äußeren Einflüssen spielen Genetik und chromosomale Veränderungen eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Fibrosarkomen (HOOTS, 2001, KALAT et al., 1991, MAYR et al., 1991, MAYR et al., 1994, Mayr et al., 1996, MCNIEL, 2001). Das Tumorsuppressorgen p53 und das Retinoblastom-Gen regulieren das Zellwachstum und sind mitunter in der Lage, den programmierten Zelltod auszulösen. Weil Tumorzellen gerade diese Fähigkeit fehlt und sie deshalb uneingeschränkt proliferieren, wird eine Mutation in diesen Genen mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht. Beim Fibrosarkom wird von einigen Forschungsgruppen ein besonderes Augenmerk auf das Tumorsuppressorgen p53 gelegt (MAYR et al., 1995, MAYR et al., 1998, MAYR et al., 2000, NAMBIAR et al., 2000, NAMBIAR et al., 2001, NIETO et al., 2003). Dabei können NIETO und NAMBIAR eine Überexpression von p53 in über 50 % der untersuchten Tumorzellen feststellen. Da man heutzutage von einem Multi-Stepp-Prozess der Kanzerogenese ausgeht und in gesundem Gewebe in den oben aufgeführten Studien keine Mutation im p53-Gen nachgewiesen werden konnte, wird angenommen, dass eine Mutation in diesem Gen nicht unbedingt die Ursache darstellt, sondern vielmehr einen prognostischen Wert liefert, wie maligne der einzelne Tumor ist (HERSHEY et al., 2005). So können auch BANERJI und KANJILAL in einer 2006 veröffentlichten Studie zeigen, dass die Tumoren von Katzen mit Mutation im p53 Tumorsuppressorgen deutlich früher rezidivieren und dass auch die Überlebenszeit dieser Tiere signifikant kürzer ist (BANERJI und KANJILAL, 2006). Daneben kann eine übermäßige Expression der Wachstumsfaktoren *platelet-derived growth factor* (PDGF) und seinem Rezeptor (PDGFR), *epidermal growth factor* (EGF) und seinem Rezeptor (EGFR), *transforming growth factor α* und *β* (TGF- α , TGF- β) sowie dem *fibroblast growth factor- β* , in Tumorzellen und deren Umgebung gefunden werden (HENDRICK, 1998, Nieto, 2003). Wachstumsfaktoren können bei übermäßiger Expression in einem entzündlichen Gebiet zur Aktivierung von Proto-Onkogenen wie c-jun beitragen. C-jun kann in vakzine-assoziierten Fibrosarkomen nachgewiesen werden, jedoch nicht in Fibrosarkomen anderer Genese (HENDRICK, 1998, HENDRICK, 1999). PETERINO und Mitarbeiter zeigen, dass die Expression

des zytoplasmatischen Transkriptionsfaktors *signal transducers and activators of transcription 3* (STAT3) mit dem histologischen Grad von Fibrosarkomen korreliert (PETTTERLINO et al., 2006).

Nach dem heutigen Wissensstand kann man eine virale Ätiologie der vakzine-assoziierten-Fibrosarkome ausschließen. In keiner der zahlreichen Studien von KIDNEY und Mitarbeitern kann virale Erbsubstanz mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) detektiert werden (KIDNEY et al., 2000, KIDNEY et al., 2001, KIDNEY et al., 2001, KIDNEY et al., 2001, KODNEY et al., 2002). Die Beteiligung des Felinen Leukosevirus (FeLV) wurde von ELLIS und Mitarbeitern 1996 durch immunhistochemische Untersuchungen ebenfalls widerlegt.

1.1.1. Das FeSV-induzierte Fibrosarkom

Die FeSV-induzierten Fibrosarkome machen ca. 2% aller Fibrosarkome aus (HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001). Das feline Leukosevirus (FeLV) gehört zu der Familie der Retroviren Genus Retrovirus Mammalian Typ C (GEDEK et al., 1993). Durch Rekombination des FeLV mit einem zellulären Onkogen entsteht das replikationsdefekte FeSV. Da das FeSV die reverse Transkriptase des FeLV zur Umschreibung der viralen Ribonukleinsäure (RNA) in Desoxyribonukleinsäure (DNA) und damit zur Integration ins Wirtsgenom und anschließenden Replikation benötigt, ist eine Koinfektion obligatorisch (GASKELL und BENNETT, 2002). Die betroffenen Katzen sind meist unter drei Jahren alt und die Tumoren treten oft an mehreren Lokalisationen zeitgleich auf und zeigen ein aggressives und schnelles Wachstum. Neben der Haut sind bei dieser Art von Fibrosarkomen auch oftmals innere Organe mit betroffen (KAADEN, 2002). Die Prognose ist infaust. Deshalb wird bei FeSV-induzierten Fibrosarkomen auch von einer Therapie abgesehen.

1.1.2. Das intraokuläre, posttraumatische Fibrosarkom

Die Katze neigt im Vergleich zu anderen Spezies zur Entwicklung von intraokulären Sarkomen, vornehmlich Fibrosarkomen, die wenige Monate bis Jahre nach einem Trauma oder einer Entzündung entstehen können. Bei einem

Trauma oder einer Entzündung kommt es meist zu einer Schädigung der Linsenkapsel. Da das Linsenmaterial, das bei Austritt aus der Linsenkapsel stark immunogen wirkt, eine andauernde Entzündungsreaktion auslöst, wird diese ähnlich wie beim injektions-assoziierten Fibrosarkom für die Kanzerogenese verantwortlich gemacht (DUBIELZIG et al., 1990). Das intraokuläre Fibrosarkom infiltriert zunächst diffus den Bulbus und breitet sich entlang des *Nervus opticus* aus. Erreicht der Tumor das *Chiasma opticum*, führt dies zur vollständigen Erblindung der Katze. Deshalb empfiehlt sich therapeutisch eine Bulbusexstirpation mit weiträumiger Entfernung des *Nervus opticus* (DUBIELZIG, 1984, DUBIELZIG et al., 1990).

1.1.3. Das Fibrosarkom anderer Ätiologie

Zu dieser Gruppe zählen Fibrosarkome, die weder auf ein Trauma, eine FeSV-Infektion oder auf eine Impfreaktion zurückzuführen sind. Sie machen nach einer retrospektiven Studie von ORTMANN 20% aller Fibrosarkome aus (ORTMANN, 1986). Fibrosarkome anderer Ätiologie treten oft an Kopf, Hals oder den Gliedmaßen auf (BROWN et al., 1978, ORTMANN, 1986). Da sie ein ähnliches biologisches Verhalten wie die injektions-assoziierten Fibrosarkome zeigen, gelten für sie bei gleicher Prognose auch die gleichen Therapieempfehlungen (HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001).

1.2. Inzidenz und Epidemiologie

Die Häufigkeit der postvakzinalen Entstehung von Fibrosarkomen in den USA wurde anfangs auf 1-10: 10000 geschätzt (COYNE et al., 1997, MACY und HENDRICK, 1996, O'ROURKE, 2004). 2002 wird eine World-Wide-Web-gestützte Studie veröffentlicht, in der die Entstehung von Fibrosarkomen in den USA und Kanada nach Impfungen mit einer Rate von 0,63 Fibrosarkomen pro 10000 Impfungen angegeben wird (GOBAR und KASS, 2002). Die Inzidenz ist demnach niedriger als zunächst angenommen. Für Europa liegen derzeit keine Daten vor. Da die Impfhäufigkeit aber jener von Nordamerika entspricht, wird ein ähnliches Vorkommen erwartet. Das injektions-assoziierte Fibrosarkom tritt bei Katzen jeden Alters auf, die meisten betroffenen Tiere sind jedoch zwischen 8 und 12 Jahre alt. Es besteht keine Rasse- oder Geschlechterprädisposition

(HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001).

1.3. Das klinische Erscheinungsbild

Vakzine-assoziierte Fibrosarkome kommen in der Regel an den typischen Injektionsstellen vor: Nach KASS et al findet man 84% aller vakzine-assoziierten Fibrosarkome in der Interscapular-Region, 6% am Oberschenkel, 5% an den Flanken, 3% in der Lumbar-Region und 2% in der Gluteal-Region (KASS et al., 2003). Seltener findet man Fibrosarkome an Stellen wie Kopf, Abdomen, Schwanz oder den Gliedmaßen (HENDRICK et al., 1994, DODDY et al., 1996).

Im Vergleich zu nicht-injektions-assoziierten Fibrosarkomen, die oft kutan liegen, kommen injektions-assoziierte Fibrosarkome signifikant häufiger in der Subkutis vor (DODDY et al., 1996). Sie präsentieren sich als derbe, solide, nicht schmerzhafte Umfangsvermehrungen, die sich palpatorisch gut abgrenzen lassen. Bei Exstirpation ist eine Pseudokapsel sichtbar. Histologisch weist der Tumor jedoch ein stark infiltratives Wachstum auf, so dass Tumorausläufer entlang der Faszien bis in angrenzende Gewebe ziehen. Sogar knöcherne Strukturen wie Dornfortsätze oder Rippen können mitbetroffen sein (BROWN et al., 1978, DODDY et al., 1996). Anhand von computertomographischen Untersuchungen geht McENTEE davon aus, dass die tatsächliche Tumorgröße doppelt so groß ist als bei der klinischen Untersuchung angenommen wird (McENTEE, 2000). Durch schnelles Wachstum und damit verbundener unzureichender Blutversorgung kann es zur Nekrose des Tumorzentrums kommen (Couto et al., 2002). Da sich das abgestorbene Zellmaterial zersetzt, kommt es in Folge zur Bildung eines flüssigkeitsgefüllten Hohlraums. Nicht selten kommt es deshalb gerade bei sehr großen oder schnell wachsenden Fibrosarkomen zur Ulzeration der Haut, mit nachfolgender Entleerung nekrotischen Tumormaterials. Die Abbildung 1 zeigt ein Fibrosarkom bei einer Katze in der Interscapular-Region.



Abbildung 1: Fibrosarkom einer Katze im Interscapular-Bereich. Aus dem Fotoarchiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München.

1.4. Das histologische Erscheinungsbild

Neben den in der Anzahl dominierenden Fibrosarkomen zählen auch Rhabdomyosarkome, Myxosarkome, Chondrosarkome, fibröse Histiozytome und undifferenzierte Sarkome zu den injektions-assoziierten Sarkomen (HENDRICK und BROOKS, 1994, MADEWELL et al., 2001). Das histologische Bild wird von pleomorphen Spindelzellen, mehrkernigen Riesenzellen und histiozytären Zellen geprägt (HENDRICK und BROOKS., 1994). Daneben sind Myofibroblasten zu finden. Diese mesenchymale Zellen mit fibroblastenartigem Aussehen sind in der Lage Kollagen zu produzieren. Sie besitzen jedoch im Gegensatz zu Fibroblasten die Fähigkeit, sich zu kontrahieren, und formieren sich zu einer Pseudokapsel (MADEWELL et al., 2001). In der Peripherie um den Tumor sieht man als Zeichen der Entzündung folliculäre Lymphozytenaggregate und Plasmazellen. Von COUTO und Mitarbeitern wird gezeigt, dass diese Lymphozytenaggregate vornehmlich aus T-Lymphozyten bestehen (COUTO et al., 2002). Eine solche Aggregatbildung war bisher nur von B-Lymphozyten bekannt. Es wird vermutet, dass das enge und kontraktile Maschenwerk der Pseudokapsel die T-

Lymphozyten am Eindringen in den Tumor hindert und sich auf diese Weise die Ansammlung der T-Lymphozyten formieren kann (COUTO et al., 2002).

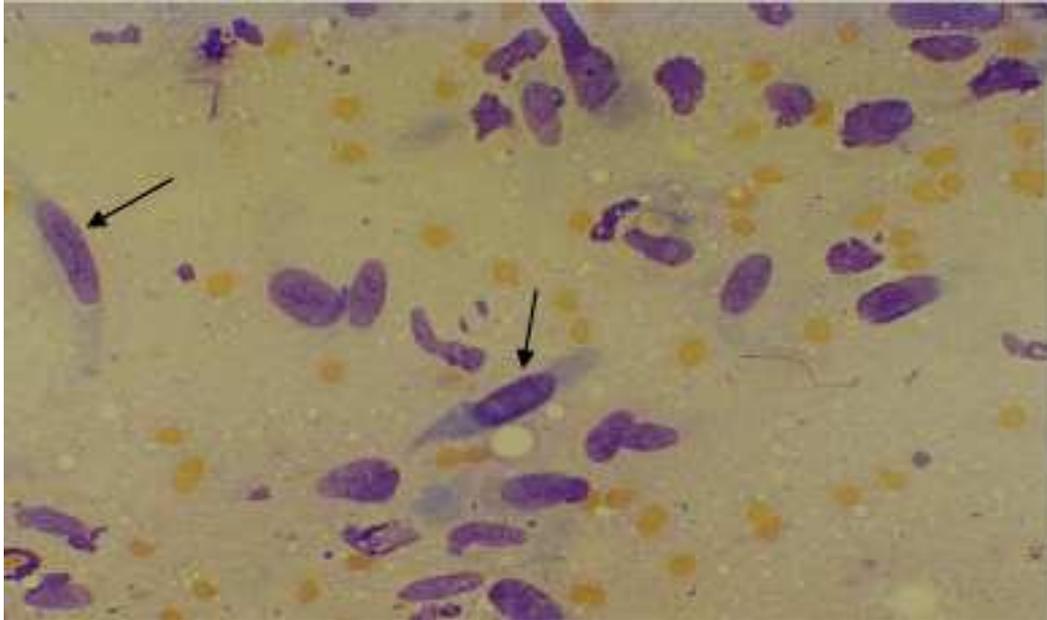


Abbildung 2: Spindelzellen in einen Tumorabkratzpräparat, modifizierte Wright-Färbung. Aus dem Fotoarchiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München.

1.5. Therapiemöglichkeiten

Neben der Chirurgie, die als Standardtherapie in der Behandlung des feline Fibrosarkoms gilt, werden zur Verbesserung der Heilungsaussichten sowohl die Radiotherapie als auch die Chemotherapie adjuvant als weitere Therapieformen eingesetzt. Vor allem in der Forschung nimmt aber auch die Immuntherapie einen immer größer werdenden Stellenwert ein. Im Folgenden soll auf die einzelnen Therapiemöglichkeiten näher eingegangen werden.

1.5.1 Chirurgie

Die 1996 gegründete Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force (VAFSTF) veröffentlichte 1999 Richtlinien zur Diagnose, Behandlung und Prävention von Fibrosarkomen. Laut diesen Richtlinien wird eine radikale Tumorexstirpation mit einem seitlichen Mindestabstand von 2 cm zum palpierbaren Tumorrund und ein

Tiefenabstand von mindestens einer Faszien- oder Muskelschicht gefordert. SEGUIN empfiehlt sogar einen Sicherheitsabstand von 3 cm zum gesunden Gewebe und mindestens einer gesunden Faszien- oder Muskelschicht in der Tiefe (SEGUIN, 2002). Generell gilt, dass je großzügiger die Tumorexstirpation erfolgt, die Wahrscheinlichkeit auf ein Rezidiv sinkt. So zeigen HERSHEY und Mitarbeiter, dass Katzen, deren Tumoren mittels einer „weiten“ Operationstechnik entfernt wurden, eine längere mittlere rezidivfreie Zeit aufweisen als Katzen, deren Tumoren „marginal“ entfernt wurden (HERSHEY et al., 2000). DAVIDSON und Mitarbeiter können mit 400 Tagen eine signifikant höhere Überlebenszeit von Katzen darstellen, deren Fibrosarkom vollständig entfernt wurde, verglichen mit 241 Tagen bei Katzen mit unvollständiger Tumorexstirpation (DAVIDSON et al., 1997). Als weiteres Beispiel für den Vorteil einer radikalen Operationstechnik sind vergleichsweise längere rezidivfreie Zeiten bei Katzen, deren Fibrosarkom mittels einer Gliedmaßenamputation entfernt wurde (DAVIDSON et al., 1997, AL SARRAF, 1998, HERSHEY et al., 2000).

1.5.2. Radiotherapie

Neben der Chirurgie und der Chemotherapie ist die Radiotherapie ein wichtiger Bestandteil in der Behandlung von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze. In den sechziger Jahren wurde die Bestrahlungstherapie in den USA als routinemäßige Therapiemaßnahme zur Behandlung caniner und feliner Tumorerkrankungen etabliert (SIMON et al., 2001). Sowohl die prä- als auch die postoperative Bestrahlung werden heute in der Veterinärmedizin als eine vielversprechende adjuvante Therapieform in der Behandlung von Fibrosarkomen betrachtet (COHEN et al., 2001, CRONIN et al., 1998, KOBAYASHI et al., 2002). In der 2002 veröffentlichten Studie von KOBAYASHI und Mitarbeitern, in der 92 Katzen präoperativ mit einer Dosis von 48 Gray in jeweils 16 Fraktionen bestrahlt wurden, liegt die mediane rezidivfreie Zeit bei 584 Tagen. Hier fällt allerdings auf, dass die 59 Katzen, bei denen die Tumoren mit tumorfreien Schnitträndern entfernt wurden, eine deutlich längere mediane rezidivfreie Zeit von 986 Tagen zu 292 Tagen aufweisen. Von den 59 Katzen mit kompletter Tumorresektion liegt die Rezidivrate bei 42% (KOBAYASHI, et al., 2002). Auch CRONIN und Mitarbeiter können mit einer Rezidivrate von 54% und einer

medianen rezidivfreien Zeit von 398 Tagen bei 33 präoperativ bestrahlten Tieren ähnliche Ergebnisse erreichen (CRONIN et al., 1998). In der erst kürzlich von MAYER und Mitarbeitern veröffentlichten Studie, in der 79 Katzen entweder prä- oder postoperativ bestrahlt wurden, liegt die Überlebensrate nach einem Jahr bei 61,1% und nach zwei Jahren bei 41,6%. Vergleicht man die Überlebensrate nach zwei Jahren von prä- und postoperativ bestrahlten Tieren, liegt diese bei 29,2 bzw. 47,2%. Gleichermäßen auffallend ist, dass jene Katzen, die die präoperative Bestrahlung erhalten hatten, eine signifikant kürzere Gesamtüberlebenszeit mit 310 Tagen aufwiesen, im Vergleich zu den postoperativ bestrahlten Tieren, deren Überlebenszeit 705 Tage betrug. Dem Autor zufolge ist dies durch eine ungleiche Auswahl der Tiere in den beiden Bestrahlungsgruppen zu erklären, da die Tumoren der präoperativ bestrahlten Katzen im Durchschnitt größer waren (MAYER et al., 2009).

1.5.3. Chemotherapie

Die Empfindlichkeit von Fibrosarkomzellen gegen verschiedene Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Mitoxantron und Paclitaxel wurde bereits in vitro nachgewiesen (BANERJI et al., 2002, WILLIAMS et al., 2001). Bei Vincristin, Carboplatin sowie Methotrexat ist dagegen kein zytoreduktiver Effekt zu erkennen. In einer klinisch kontrollierten Studie von MARTANO und Mitarbeitern, in der die Katzen neben der operativen Fibrosarkomentfernung mit Doxorubicin therapiert wurden, konnte kein signifikanter Unterschied in den Rezidivraten, der rezidivfreien Zeit und der medianen Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (MARTANO et al., 2005). POIRIER vergleicht in seiner 2002 veröffentlichten Studie die Wirksamkeit von Doxorubicin mit der von Doxil, ein in Liposomen verpacktes Doxorubicin. Die Katzen erhielten hier adjuvant zur operativen Tumorexstirpation entweder Doxorubicin oder Doxil. Es konnte kein Unterschied in der mittleren rezidivfreien Zeit (MRFZ) beider Gruppen festgestellt werden. Beim Vergleich mit einer historischen Kontrollgruppe, die eine alleinige Tumorexstirpation erhielt, wurde ein Unterschied in der MRFZ von 388 zu 93 Tagen deutlich. Wegen der erhöhten Haut- und Nephrotoxizität von Doxil ist dem Autoren zufolge die freie Form von Doxorubicin vorzuziehen (POIRIER et al., 2002). 2007 veröffentlichten HAHN eine retrospektiv ausgewertete Studie, in der alle Katzen nach unvollständiger

Tumorexstirpation eine Radiotherapie erhielten. Die Katzen, die zur Therapiegruppe zählten, bekamen zudem eine Chemotherapie mit Doxorubicin. Zwar konnte kein Unterschied in der mittleren Überlebenszeit (MÜZ) festgestellt werden, der Unterschied der MRFZ ist jedoch mit 15,4 Monaten im Vergleich zu 5,7 Monaten signifikant (HAHN et al., 2007). In einer erst 2009 veröffentlichten Studie von SABA konnte ein klinisches Ansprechen der Tumoren auf Lomustin, ein oral zu verabreichendes Chemotherapeutikum, demonstriert werden. Generell war das Ansprechen aber eher schlecht, so dass von den bisher 10 ausgewerteten Katzen nur eine Katze eine komplette Remission erzielte, und auch diese dauerte nur weniger als 7 Tage an. Des Weiteren wurde von einer hohen hämatologischen Toxizität berichtet, in der die Neutropenie den dosislimitierenden Faktor darstellt (SABA et al., 2009).

Bei der Elektrochemotherapie soll durch elektrische Impulse die Zellmembran der Tumorzellen für Chemotherapeutika so permeabel gemacht werden, dass diese besser zur DNA vordringen und dort wirken können. In einer Studie von MIR wurde dieses Verfahren als Monotherapie eingesetzt, indem Bleomycin intravenös als Bolus verabreicht und der solide Tumor zuvor mit elektrischen Impulsen vorbereitet wurde. Die behandelten Katzen wurden alle mit großen rezidierten und inoperablen Tumoren vorgestellt. Die MÜZ der therapierten Katzen war mit 6,1 Monaten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe mit 0,8 Monaten signifikant länger. Hier sollte jedoch erwähnt werden, dass die Tumoren der Kontrollgruppe deutlich größer waren als die der Therapiegruppe (MIR et al., 1997). SPUGNINI und Mitarbeiter untersuchten den intra- und postoperativen Effekt der Elektrochemotherapie mit Bleomycin, verglichen mit einer Kontrollgruppe, die ausschließlich eine Tumorexstirpation erhielt. Die MRFZ betrug bei der intraoperativ behandelten Gruppe 12 Monate, bei der postoperativ behandelten Gruppe 10 Monate und bei der Kontrollgruppe nur 4 Monate (SPUGNINI et al., 2007).

1.5.4. Immuntherapie

Bei der Immuntherapie soll das körpereigene Immunsystem mittels Botenstoffen dazu stimuliert werden, gegen Tumorzellen anzukämpfen. Die Botenstoffe werden bei der klassischen Immuntherapie direkt in den Tumor oder das

Tumorbett injiziert. Benutzt man Gensequenzen in Form von Viren oder Plasmiden als Vektoren, die für bestimmte Botenstoffe kodieren, so spricht man von der immunologischen Genterapie.

Der aus der Aloe-Vera-Pflanze stammende unspezifische Immunmodulator Acemannan soll Makrophagen aktivieren und diese zur Ausschüttung von IL-1, IL-6, IFN- γ und *Tumornekrosefaktor- α* (TNF- α) anregen. Daneben soll es die Aktivität von Natürlichen Killerzellen steigern und für die Reifung von dendritischen Zellen mitverantwortlich sein. Nach DJERABA und QUERE erfüllt Acemannan somit antivirale als auch antineoplastische Wirkung. In einer unkontrollierten Studie von KING und Mitarbeitern, in der acht Hunde und fünf Katzen neben der Tumorexstirpation und der Bestrahlung adjuvant mit Acemannan behandelt wurden, konnten drei der behandelten Katzen die Studie rezidivfrei verlassen, eine Katze verstarb post operationem und eine Katze zeigte ein Lokalrezidiv an Tag 204 (KING et al., 1995). Auch KENT testete diese Substanz an drei Katzen intratumoral und gleichzeitig intraperitoneal. Zwei der Katzen erhielten zusätzlich eine Tumorexstirpation. Die eine Katze bekam nach zwei Monaten ein lokales Rezidiv, die andere Katze blieb rezidivfrei (KENT 1993). Aufgrund der geringen Fallzahlen können jedoch keine Aussagen über die Effektivität von Acemannan getroffen werden. In der 1996 veröffentlichten Studie von QUINTIN-COLONNA und Mitarbeitern wurde das Fibrosarkom als Tumormodell genutzt, um die Wirksamkeit von humanem (hu)IL-2 zu untersuchen. Von den 32 Studientieren erhielten alle eine Tumorexstirpation und eine Bestrahlungstherapie, 16 davon zusätzlich sieben subkutane Injektionen mit huIL-2 sezernierenden Verozellen. Die Rezidivrate der Therapiegruppe war mit 31% signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe mit 69%. Und auch die Überlebenszeit der behandelten Tiere war mit 16 Monaten doppelt so lang als die der Kontrollgruppe. Bis auf eine anaphylaktische Reaktion bei einer Katze konnten keine Nebenwirkungen festgestellt werden (QUINTIN-COLONNA et al., 1996). JOURDIER und Mitarbeiter behandelten ihre Therapiegruppe neben der chirurgischen Tumorentfernung und einer Brachyradiotherapie, die auch die Kontrollgruppe erhielt, zusätzlich mit einer Genterapie. Die in einem Zeitraum von acht Wochen subkutan injizierten Kanarienviren- bzw. Vacciniaviren sezernierten entweder humanes oder felines IL-2. Dabei konnten sie einen Rückgang der Rezidivrate von 61% (Kontrollgruppe) auf 39% (huIL-2) bzw. 28%

(feIL-2) feststellen (JOURDIER et al., 2003). SIDDIQUI und Mitarbeiter wiesen in ihrer Studie die Expression von IL-12 und IFN- γ nach einer einstündigen Hitzeschockbehandlung von 41°C in Tumorbiopaten nach. Zuvor wurden die Tumoren mit einem adenoviralen Vektor inklusive Hitzeschockpromoter 70B versehen, der für IL-12 kodiert. In dieser Studie wurde die tolerierbare Dosis bestimmt. Es wurde keine Aussage über Rezidivraten getroffen (SIDDIQUI et al., 2007).

An der medizinischen Kleintierklinik der LMU München wurden in den letzten Jahren mehrere Dissertationen abgeschlossen, in denen verschiedene Therapiemöglichkeiten der adjuvanten Immuntherapie beim Fibrosarkom in Phase-I-Studien untersucht wurden. Alle am Fibrosarkomprojekt teilnehmenden Tiere erhielten eine Tumorexstirpation als Basistherapie. In der von WIELAND vorgestellten Studie wurden den Katzen fünfmalig postoperativ adenovirale Vektoren subkutan injiziert, die für huIL-2 und feIFN- γ kodieren. Die Toxizität blieb gering, so dass nur in der höchsten Dosisgruppe Nebenwirkungen in Form von einer Erhöhung der Körperkerntemperatur und einem Anstieg der Aspartat-Amino-Transferase im Serum (AST) zu verzeichnen war (WIELAND, 2002). Genau diese Dosis von 5×10^8 internationalen Einheiten Adenoviren, die für huIL-2 und feIFN- γ kodieren, verwendete auch WIEDMANN, die die Gentherapie allerdings zweimalig präoperativ und intratumoral applizierte. Da es bei den Studientieren aber zu einer nicht tolerierbaren Toxizität in Form von Gewichtsreduktion, Anstieg der Körpertemperatur, Abnahme des Hämatokrits sowie Leuko- und Thrombozytopenien kam, wurde für eine Phase-II-Studie die maximale tolerierbare Dosis von 1×10^8 IE festgelegt (WIEDMANN, 2005). KEMPF verwendete 2005 in ihrer Studie erstmals die Kombination aus drei feline Zytokingenen: IL-2, IFN- γ und dem Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF). Die maximal tolerierbare Dosis wurde auf 600 μg /Plasmid festgelegt. Die Applikation erfolgte durch den intraoperativen Einsatz plasmidbeladener Kollagenschwämmchen in das Tumorbett. Die maximal tolerierbare Dosis wurde auf 600 μg /Plasmid festgelegt. Allerdings konnten bei dieser Dosis geringe Nebenwirkungen in Form von Lymphozytopenien verzeichnet werden (KEMPF, 2005). Diese drei Zytokine kamen ebenfalls in der Phase-I-Studie von JAHNKE zum Einsatz. Die Katzen erhielten zweimal präoperativ eine intratumorale Applikation, mit an Eisenpartikeln gekoppelten

Plasmiden, die für die oben ausgeführten Zytokine kodieren. Durch das Verfahren der Magnetofektion wurde die Transfektionsrate erhöht. Selbstlimitierende Nebenwirkungen traten bei einer Katze auf, die mit der höchsten Dosisstufe therapiert wurde. Von den sechs Katzen, die innerhalb von einem Jahr ein Rezidiv entwickelten, waren vier Tiere jener Gruppe zuzuordnen, die die höchste Dosis erhielt (JAHNKE et al., 2007). Man vermutet einen glockenförmigen Verlauf der Dosis-Wirkungskurve für Il-2, so dass bei zu hohen Dosen kein Effekt mehr erzielt werden kann (KIRCHEIS et al., 1998, SCHMIDT et al., 1995). In einer klinisch unkontrollierten Studie von HAMPEL wurden 20 Katzen prä- und postoperativ jeweils mit 12 Injektionen mit rekombinatem felinen Interferon- ω (reFeIFN- ω) behandelt, das intratumoral bzw. subkutan injiziert wurde. Die auftretenden Nebenwirkungen wurden als mild und selbstlimitierend eingestuft. Nach einem Jahr entwickelten 9 Tiere ein Lokalrezidiv, bei einem Tier wurden Lungenmetastasen festgestellt. 10 Katzen konnten die Studie nach einem Jahr rezidivfrei verlassen. Die relativ niedrige Rezidivrate kann aber auch auf die hauptsächlich kleine Tumorgröße in der Studienpopulation zurückzuführen sein (HAMPEL et al., 2007). HÜTTINGER untersuchte in ihrer 2008 veröffentlichten Studie die Wirkung von feGM-CSF. Die Plasmide wurden hier ähnlich wie bei JAHNKE zweimalig präoperativ an Eisenpartikeln gebunden intratumoral appliziert. Auch in dieser Dosis-Eskalations-Studie konnte die höchste Dosis mit 1250 μ g Plasmid, das für GM-CSF kodiert, als sicher festgelegt werden. Von den 20 behandelten Katzen entwickelten acht Katzen (40%) ein Lokalrezidiv, eine davon mit nachweisbaren Lungenmetastasen. Dieses Ergebnis ist sehr vielversprechend (HÜTTINGER et al., 2008). Die Auswertungen der anschließenden Phase-II-Studie werden in Kürze erwartet.

1.6. Prognose

Die Prognose ist bei Fibrosarkomen aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Lokalrezidiven als schlecht zu beurteilen (HIRSCHERBERGER und KESSLER, 2001). Vor allem ist die Resezierbarkeit, und somit die Größe und die Lokalisation des Tumors, als prognostischer Faktor bedeutend. In einer Studie von GRÖSSLINGER und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass die Anzahl rezidivfreier Katzen mit einem vergrößerten Resektionsabstand zu den Tumorgrenzen steigt (GRÖSSLINGER et al., 2003). Die marginale Resektion hat

im Gegensatz zur radikalen eine deutlich schlechtere Prognose (HERSHEY et al., 2000). Auch haben Primärtumore eine deutlich bessere Prognose als Rezidive (COHEN et al., 2001).

1.6.1. Rezidivrate

Die Gefahr der Rezidivbildung ist beim Fibrosarkom sehr hoch. Der Anteil der Katzen, die nach chirurgischer Tumorentfernung als Standardtherapie ein Rezidiv bekommen, liegt bei bis zu 70% (BOSTOCK und DYE, 1979, MC ENTEE und PAGE, 2001, STIGLMAIR und HERB, 1987, ORTMANN 1986). Die Rezidive treten häufig bereits kurz nach der Tumorexstirpation auf. So wird von ORTMANN sowie auch von STIGLMAIR und HERB eine MRFZ von 105 Tagen angegeben (ORTMANN, 1986, STIGLMAIR und HERB, 1987). In diesen Studien wurde jedoch keine Angabe zur Operationstechnik gemacht. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Rezidivs sinkt, je radikaler die Tumorexstirpation erfolgt und macht somit auch die Prognose besser. Die Vorteile einer radikalen Operationstechnik wurden mitunter von KUNTZ und POWERS aufgezeigt. Nach einer radikalen Operationsmethode, in der die Tumoren von 19 Katzen mit einem seitlichen Abstand von 5 cm und mindestens 2 Muskelschichten in die Tiefe entfernt wurden, konnte bei keinem der 19 Tiere im Beobachtungszeitraum von 433 Tagen ein Rezidiv festgestellt werden (KUNTZ und POWERS, 2000). Auch LIDBETTER konnte nach Entfernung der seitlichen Körperwand bei keinem Tier im Untersuchungszeitraum bis 24 Monate nach Operation ein Rezidiv beobachten (LIDBETTER et al., 2002).

1.6.2. Metastasierungsrate

Injektions-assoziierte Fibrosarkome metastasieren der Fachliteratur zufolge mit einer Häufigkeit zwischen 10 und 24% (COUTO und MACY, 1998, HERSHEY et al., 2000). Metastasen treten vornehmlich in der Lunge auf, gefolgt von den regionalen Lymphknoten und den inneren Organen (CRONIN et al., 1998, HERSHEY et al., 2000, ROMANELLI et al 2008). Die Wahrscheinlichkeit der Metastasenbildung steigt mit dem wiederholten Auftreten von Rezidiven und der Zeit des Tumorbestehens an.

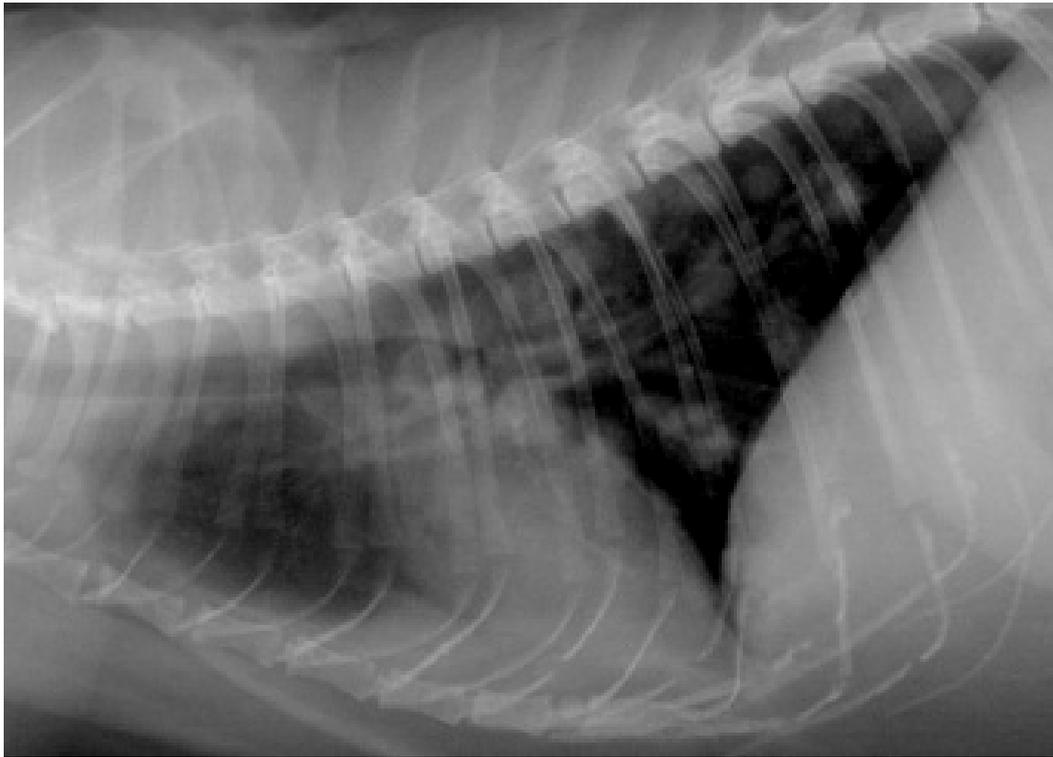


Abbildung 3: Multiple Lungenmetastasen bei einer Katze mit felinem Fibrosarkom; laterolateraler Strahlengang. Aus dem Fotoarchiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München.

1.7. Prävention

Wegen den hohen Rezidivraten und der damit schlechten Prognose soll bei den Praktikern besonderes Augenmerk auf die Prävention gelegt werden. Hierzu gibt die VAFSTF Richtlinien heraus, die das möglichst frühe Aufspüren von Fibrosarkomen möglich machen und die Resezierbarkeit erleichtern sollen:

1. Nach Möglichkeit den Impfstoff auf alternativem Weg (Bsp. intranasal, topisch) anwenden.
2. Nur gegen jene Erreger impfen, denen das Individuum ausgesetzt ist, d. h. auf eine individuelle Impfanamnese achten und Risiken abschätzen.
3. Keine Injektionen im Interscapularbereich, da Tumoren hier sehr schlecht zu resezierbar sind. So sollen Impfungen gegen Tollwut in das rechte Hinterbein, gegen FeLV in das linke Hinterbein und Impfungen gegen Katzenschnupfen sowie Panleukopenie in die rechte Schulter appliziert werden.

4. Impflokalisation im Impfbuch vermerken.
5. Besteht eine Impfreaktion länger als drei Monate nach Injektion, ist sie größer als 2 cm, oder nimmt sie einen Monat nach Injektion noch an Größe zu, ist eine Biopsie zu entnehmen und bei positivem Befund ist der Tumor sofort radikal zu entfernen.

2. Tumormunität

Es ist bekannt, dass das Immunsystem neoplastische Zellen bekämpfen kann. Die wesentliche Aufgabe übernehmen dabei die T-Lymphozyten, die natürlichen Killerzellen und die Makrophagen. Infiltrate aus diesen Zellen sind bei histologischen Untersuchungen in Tumoren und ihrer Umgebung zu finden (BLATTMAN und GREENBERG, 2004). Bei Lebewesen, deren Immunsystem geschwächt ist, treten häufiger Tumoren auf als bei Gesunden. Als Beispiel wäre hier das fünffach höhere Risiko einer Lymphom- oder Leukämieerkrankung bei mit dem feline Immundefizienz-Virus (FIV)-infizierten Katzen, oder die Entstehung des Kaposi-Sarkoms bei mit dem Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV)-infizierten Menschen zu nennen. Da Tumorzellen jedoch im Vergleich zu anderen Pathogenen keinen besonders stark immunogenen Charakter zeigen und sie sogenannte Tumor-escape-Mechanismen entwickelt haben, gelingt es Tumorzellen immer wieder, sich dem Immunsystem zu entziehen. Dies ist der Grund, warum auch gesunde Individuen erkranken können. Im Folgenden sollen die Zusammenhänge näher erläutert werden.

2.1. Tumorantigene

Obwohl Neoplasien von gesunden Zellen abstammen und somit autologen Ursprungs sind, werden sie während ihrer malignen Transformation mit Oberflächenmolekülen bestückt, die vom körpereigenen Immunsystem als fremd erkannt werden. Diese Tumorantigene können Immunreaktionen auslösen, die gegen neoplastische Zellen gerichtet sind. Hier sind zwei Hauptgruppen von Tumorantigenen zu unterscheiden. Tumor-assoziierte Antigene sind an der

Zelloberfläche anheftende Proteine, die auch von normalen, nicht malignen Zellen exprimiert werden. Die Expression dieser Antigene erfolgt bei Tumorzellen verstärkt. Tumor-spezifische Antigene dagegen werden von gesunden erwachsenen Zellen nicht mehr gebildet. Man kann diese Proteine demnach nur auf maligne entarteten Zellen vorfinden. Als Beispiel sollen hier die onkofetalen Antigene, wie etwa das Alpha-Fetoprotein und das karzinoembryonale Antigen sowie die gewebspezifischen Antigene, wie Mart-1/Malan-A bei Melanomen, genannt werden (TIZARD, 2004, BREMERS und PARMIANI, 2000). Tumor-spezifische Antigene werden in der Humanmedizin gerne zur Tumorfrüherkennung oder zu Verlaufskontrollen als Diagnostikum eingesetzt (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001).

2.2. MHC-Komplex

Der Major-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) repräsentiert eine Gruppe von Genen, die für bestimmte Zelloberflächenantigene, die sogenannten MHC-Antigene, kodiert. Durch ihn wird es dem Immunsystem mitunter ermöglicht, körperfremd von körpereigen zu unterscheiden. Dies erfolgt über die Repräsentation von Proteinstrukturen durch den MHC-Komplex. Wird eine Zelle von einem Pathogen befallen oder durchläuft sie eine maligne Transformation, so werden von ihr Proteine gebildet, die nicht körpereigen sind. Wird ein dem Körper fremdes Protein durch den MHC-Komplex dem Immunsystem präsentiert, so wird die betroffene Zelle eliminiert. Man unterscheidet MHC-Klasse-I-Moleküle und MHC-Klasse-II-Moleküle.

MHC-I-Moleküle kommen auf fast allen kernhaltigen Körperzellen des Organismus vor (ELMSLIE und DOW, 1997). An sie werden im endoplasmatischen Retikulum einer jeden Zelle Fragmente endogen produzierter Antigene geknüpft und anschließend an der Zelloberfläche zur Repräsentation gebunden (CATROS-QUEMMER et al., 2003). Die MHC-I-Moleküle dienen der Antigenpräsentation für zytotoxische T-Lymphozyten (CD8+-T-Zellen) (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001). Daneben werden durch sie jedoch auch körpereigene Zellen vor einer Zerstörung durch diese geschützt.

MHC-II-Moleküle werden nur von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) gebildet. Von ihnen präsentierte Antigene werden von T-Helfer-Zellen (CD4+-T-

Zellen) erkannt. Auch Restpartikel von abgestorbenen Tumorzellen werden von APC aufgenommen und deren Proteine, also die Tumorantigene, werden über MHC-II-Moleküle dem Immunsystem präsentiert (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001).

2.3. Effektorzellen der Tumorimmunität

Die Hauptakteure in der Tumorimmunität sind die CD8+ und die CD4+-T-Lymphozyten und die natürlichen Killerzellen. Zu ihrer Aktivierung müssen sie jedoch mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC) interagieren. Zu den APC zählen Dendritische Zellen (DC), Makrophagen, Monozyten und B-Zellen. Im Folgenden soll auf die einzelnen Zellen und ihrer Funktion in der Tumorimmunität näher eingegangen werden.

2.3.1. CD8+-T-Lymphozyten

CD8+-T-Lymphozyten können mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) ausschließlich an MHC-I-Molekül-gebundene Antigene an Zelloberflächen binden. Zu ihrer Aktivierung ist jedoch ein zweites Signal notwendig. Dieses kann durch die gleichzeitige Bindung mit dem Kostimulationsmolekül B7, oder durch den Einfluss von stimulatorischen Zytokinen erfolgen (RIBAS et al., 2000, VAN SEVENTER et al., 1991)). Ist der zytotoxische T-Lymphozyt aktiviert, wird die Zielzelle entweder durch die Freisetzung von Perforin oder durch Apoptose zerstört (ELMSLIE und DOW, 1997).

2.3.2. CD4+-T-Lymphozyten

CD4+-T-Zellen binden nur an MHC-II-Molekülen, die auf APC präsentiert werden. APC phagozytieren Pathogene und Zelltrümmer. Die von ihnen an MHC-II-Molekülen präsentierten fremden Antigene sind somit exogener Natur. Zur vollständigen Aktivierung der T-Helfer-Zelle ist auch hier ein Kostimulus in Form von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1) notwendig. Nach Aktivierung produziert die T-Helfer-Zelle stimulatorische Zytokine wie IL-2, IFN- γ und TNF-alpha, die die zytotoxische T-Zellen aktivieren (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001).

Gleichzeitig kommt es durch die Interaktion der CD-40-Liganden auf der T-Helfer-Zelle mit dem CD-40-Rezeptor auf der APC zu einer Aktivierung der APC (BERNNETT et al., 1998, SCHOENBERGER et al., 1998). Die APC reagieren daraufhin mit einer vermehrten Expression von MHC-I-Molekülen, Zytokinen und anderen Kostimulationsmolekülen, was zu einer vermehrten Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen führt. Von den Bindungspartnern werden zudem aber auch verschiedene inhibitorische Zytokine (IL-4, IL-5, IL-10 und TGF- β) ausgeschüttet, um eine Überstimulation des Immunsystems zu unterbinden (MOSMANN and COFFMAN, 1989).

2.3.3. Natürliche Killerzellen (NKZ)

Natürliche Killerzellen gehören zu den Zellen des angeborenen Immunsystems. Ihre Wirkung erfolgt somit unspezifisch. Von ihnen werden alle Zellen angegriffen, die keine, sehr wenige oder abnorme MHC-I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (FOSS, 2002). Somit sind gesunde Wirtszellen vor einem Angriff von NKZ geschützt. NKZ werden wesentlich durch Zytokine reguliert. IL-2 und IFN- γ und IL-4 veranlassen NKZ zur Proliferation und steigern deren zytotoxische Aktivität. TNF- α und IL-12 führen zu einer vermehrten Produktion von IFN- γ , was eine weitere Differenzierung fördert und Makrophagen aktiviert (TIZARD, 2004). Werden NKZ in vivo erhöhten Mengen an IL-2 ausgesetzt, so kann ihre antitumorale Aktivität um ein vielfaches gesteigert werden. IL-2-aktivierte Zellen werden als Lymphokin-aktivierte-Killerzellen (LAK-Zellen) bezeichnet (ROITT et al., 1996).

2.3.4. Antigenpräsentierende Zellen (APC)

Antigenpräsentierende Zellen werden vornehmlich in Haut, Lymphknoten, Milz und Thymus gefunden. Sie stellen eine heterogene Population von Leukozyten mit hervorragend immunstimulierenden Eigenschaften dar (ROITT et al., 1996). Zu ihnen zählen die Dendritischen Zellen, die Makrophagen und die B-Zellen. APC phagozytieren Pathogene und Zelltrümmer. Die von ihnen an MHC-II-Molekülen präsentierten fremden Antigene sind somit exogener Natur und veranlassen bei Bindung mit CD4⁺-T-Lymphozyten diese zu einer Reaktion.

Daneben exprimieren sie aber auch MHC-I-Moleküle, so dass auch CD8+-T-Lymphozyten aktiviert werden können (EMLSIE und DOW, 1997).

2.3.5. Makrophagen

Makrophagen können in in-vitro-Versuchen Tumorzellen viel effizienter abtöten als gesunde Zellen. Wie sie von Tumorzellen dazu aktiviert werden, ist unklar. Mögliche Mechanismen sind die direkte Erkennung von Tumoroberflächenantigenen oder die Aktivierung durch IFN- γ produzierende tumorspezifische T-Zellen. Die setzen daraufhin lysosomale Enzyme, Sauerstoffradikale oder TNF- α frei, um die Zielzelle zu eliminieren. Der TNF- α wirkt antitumoral, indem er Blutzufuhr des Tumors durch Thrombosebildung unterbindet (TIZARD, 2004).

2.4. Tumor-escape-Mechanismen

Tumore haben verschiedene Strategien entwickelt, sich dem Immunsystem zu entziehen. Dies ist der Grund, warum es trotz der Tumorummunität zum Tumorwachstum kommt. Diese Mechanismen werden als Tumor-escape bezeichnet. Im Folgenden sind die wichtigsten dieser Mechanismen aufgeführt:

Tumorzellen, insbesondere Fernmetastasen, weisen oft ein Fehlen oder eine verminderte Expression von MHC-I-Molekülen an ihrer Oberfläche auf. Dies wird der negativen Selektion von MHC-I-Klonen durch das Immunsystem zugeschrieben (COSTELLO et al., 1999). Es wird jedoch vermutet, dass es lediglich zu einer verminderten Expression unterhalb der Nachweisgrenze von MHC-I-Molekülen kommt, da bei einem vollständigen Verlust NKZ diese Zellen zerstören würden (EMLSIE und DOW, 1997).

Ein zweiter Mechanismus stellt die fehlende Expression von Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen, wie zum Beispiel das B7 Molekül, dar (BLATTMAN und GREENBERG, 1994). Auch dies führt zu einer fehlenden Erkennung durch T-Lymphozyten.

Tumorzellen können auf ihrer Oberfläche den sogenannten Fas-Liganden exprimieren. Bindet dieser an den Fas-Rezeptor von T-Lymphozyten, wird die

Apoptose der Effektorzelle induziert (O'CONNELL et al., 1999). Tumorzellen sind gegen die Fas-Ligand-induzierte Apoptose häufig resistent. Fas-Liganden werden von vielen Lymphom-, Melanom- oder Kolonkarzinomzellen gebildet, um eine Infiltration von T-Lymphozyten abzuwehren (PLUMAS et al., 1998).

Des Weiteren sind Tumorzellen imstande, bestimmte Moleküle in ihre Umgebung zu sezernieren, um vom Immunsystem nicht erkannt zu werden, oder dieses zu unterdrücken. Dazu zählen von Tumoren gebildete neuraminsäurehaltige Mucopolysaccharide, die sich wie eine Schleimkapsel um die Tumorzelle legen und somit die Antigenerkennung für T-Lymphozyten unmöglich machen (ABBAS et al., 1996). Aber auch inhibitorisch wirkende Zytokine können die Aktivität der Zellen des Immunsystems hemmen (FOSS, 2002).

3. Immuntherapie bei Tumoren

Der New Yorker Arzt Dr. William Coley konnte bereits vor über 100 Jahren einen antitumoralen Effekt durch die unspezifische Aktivierung des Immunsystems mit Bakterienextrakten demonstrieren (COLEY, 1896). Paul Ehrlich entwickelte wenige Jahre später eine Tumorstoffimpfung auf Tumorstoffbasis im Tiermodell und belegte somit seinen Verdacht auf eine zelluläre Komponente der antineoplastischen Immunität (EHRlich, 1909).

Heute unterscheidet man unterschiedliche Formen, wie das Immunsystem aktiviert werden kann um gegen Tumorzellen vorzugehen. Im Folgenden werden kurz die Unterschiede zwischen der aktiven, spezifischen und der unspezifischen sowie der passiven und der adoptiven Immuntherapie aufgeführt.

Bei der aktiven unspezifischen Immunstimulation werden durch die Applikation bestimmter Substanzen Zellen des Immunsystems stimuliert, gegen Tumorzellen zu wirken. Als Beispiel ist hier das aus *Streptokokkus pyogenes* gewonnene Picibanil/OK-432 zu nennen, das zu einer Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und LAK-Zellen führt und die Zytokinausschüttung antreibt (TAKAHASHI et al., 1998, KIRKWOOD et al., 1997). Da mittlerweile die

Herstellung von rekombinanten Proteinen kostengünstig und in großen Mengen erfolgen kann, werden auch Zytokine immer häufiger zur unspezifischen Immunstimulation verwendet.

Bei der aktiven spezifischen Immunstimulation wird das Immunsystem mit Tumorantigenen in Form von Proteinen, Peptiden, DNA oder ganzen Zellen konfrontiert. Man spricht auch von cancer vaccines, die sowohl präventiv als auch therapeutisch zum Einsatz kommen.

Bei der passiven Immuntherapie werden dem Patienten Antikörper zugeführt. Diese binden dann kovalent spezifische Antigene der Tumoroberfläche (ABBAS et al., 2000). An solchen Antikörpern können verschiedene Substanzen wie Antikörper, Toxine oder Radionuklide gekoppelt sein, so dass die Tumorzellen den Substanzen direkt ausgesetzt sind, ohne dass gesunde Zellen beeinträchtigt werden.

Bei der adoptiven Immuntherapie werden dem Körper zunächst mononukleäre Zellen aus dem Blut oder tumorinfiltrierende Lymphozyten aus Tumorsektaten entnommen. Diese Zellen werden anschließend unter dem Einfluss hoher Dosen IL-2 kultiviert und unter der gleichzeitigen Gabe von IL-2 systemisch oder lokal reinjiziert (ABBAS et al., 2000). Die so entstandenen LAK-Zellen weisen einen hohen antitumoralen Effekt auf.

3.1. Immunstimulierende Antitumor-Gentherapie

Bei der immunstimulierenden Antitumor-Gentherapie werden die Prinzipien der antitumoralen Immuntherapie mit jenen der Gentherapie vereint. Ein bedeutender Vorteil dieser Therapieform im Vergleich zu anderen Antitumor-Therapien liegt darin, dass sie sehr tumorspezifisch wirkt und unerwünschte Effekte auf gesunde Zellen weitgehend ausbleiben (ABBAS et al., 2000). Im Kapitel 1.5.4. wurden bereits die Ergebnisse einiger Studien aufgeführt. Da in dieser Dissertation eine Phase-II-Studie zu einer immunstimulierenden Antitumor-Gentherapie abgehandelt wird, soll nun kurz auf die Grundlagen dieses therapeutischen Ansatzes eingegangen werden:

Die Gentherapie ist eine Therapieform, mit der man eine Immunstimulation erreichen kann. Sie hat das Ziel, Gensequenzen mit Hilfe von viralen oder

nonviralen Vektoren in Zellen einzuschleusen. Diese Gensequenzen kodieren für bestimmte Proteine, die das Immunsystem stimulieren sollen, maligne Zellen effektiver zu bekämpfen. Die Antitumor-Immunstimulation kann einerseits indirekt über die erhöhte Expression von Tumorantigenen erfolgen oder direkt über die zelluläre Produktion von immunstimulatorischen Zytokinen. Wie bereits im Kapitel 2.4. erwähnt, können Tumorzellen eine verminderte Expression von MHC-I-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche aufweisen. Dies führt unter anderem dazu, dass Tumorantigene unzureichend dem Immunsystem präsentiert werden. Durch die Steigerung der Expression von MHC-I-Molekülen auf neoplastischen Zellen durch die Gentherapie kann CD8⁺-T-Lymphozyten die Erkennung der Tumorzellen erleichtert werden. Werden die nun MHC-I-Moleküle tragenden Tumorzellen zerstört und ihre Zellwandfragmente von APC phagozytiert, können zudem über die MHC-II-Moleküle Expression CD4⁺-T-Lymphozyten aktiviert und so zur Zytokinausschüttung und CD8⁺-T-Zellaktivierung veranlasst werden (PARMIANI et al., 2000). Andererseits kann die Antitumor-Immunstimulation auch direkt über die zelluläre Produktion von immunstimulatorischen Zytokinen erfolgen. Es werden vor allen die stimulatorischen Zytokine IL-2, IL-4, IL-12, IFN- γ , TNF- α und GM-CSF eingesetzt. Die für ein oder mehrere Zytokine kodierenden Gene können sowohl lokal (intratumoral oder in das Tumorbett) als auch systemisch appliziert werden. Die längste Wirkungsdauer und die geringste Toxizität weist die lokale Applikation am Ort des Tumorgeschehens auf (ELMSLIE und DOW, 1997, ABBAS et al., 2000, BRILL et al., 2001). Da dieses Verfahren auch in dieser Studie angewendet wurde, werden die Wirkungen der hier verwendeten Zytokine später genauer erläutert.

3.2. Gentransfer

Die genetische Information, die von den Zielzellen exprimiert werden soll, muss dafür zunächst in die Zelle transportiert und in das zelleigene Genom integriert werden. Hierfür stehen virale und nonvirale Vektoren zur Verfügung. Auf die Vor- und Nachteile beider Systeme soll im Folgenden näher eingegangen werden.

3.2.1. Virale Vektoren

Zum viralen Gentransfer werden vor allem Adeno-, Adeno-assoziierte- und Herpes-simplex-Viren als DNA-Viren und Retroviren als RNA-Viren eingesetzt. Die Charakteristika der Zielzellen sind von entscheidender Bedeutung, welches dieser Viren als Vektoren in Frage kommt. Den Viren werden die Gene für ihre Replikationsfähigkeit entnommen und sie werden mit den gewünschten „neuen“ Gensequenzen ausgestattet, so dass ein replikationsdefektes und damit weniger pathogenes Virus entsteht. Da jedoch durch die Rekombination mit Wild-Typ-Viren ein selbstreplizierendes Virus entstehen kann, ist die Sicherheit dieser Methode nicht vergleichbar mit der des nonviralen Gentransfers. Ein entscheidender Vorteil des viralen Gentransfers ist die hohe Transfektionsrate (ARYGLE, 1999).

3.2.2. Nonvirale Vektoren

Plasmide sind ringförmig angeordnete DNA-Moleküle, die die gewünschte genetische Information tragen. Da sie sich im Organismus nicht vermehren können und nicht viralen Ursprungs sind, stellen sie eine sichere Methode dar, Zielzellen zur Produktion von den zuvor bestimmten Proteinen anzuregen. Die Herausforderung besteht darin, die Plasmide in die Zielzellen überhaupt einzuschleusen, da sie im Gegensatz zu viralen Vektoren keine Möglichkeit haben, selbstständig in die Zielzellen einzudringen. Um eine bessere Transfektion zu erreichen, werden verschiedene physikalische Methoden eingesetzt. Die Elektroporation ist ein Verfahren, bei dem in dem betroffenen Gebiet nach Injektion der Plasmide mittels Elektroden ein elektrisches Feld erzeugt wird. Dies soll zu einer erhöhten Zellpermeabilität führen und die Plasmide besser eindringen lassen (SOMIARI et al., 2000). Der Einsatz von Ultraschallwellen soll ähnliche Effekte auf die Permeabilität der Zellmembran haben und sogar Makromolekülen das Eindringen in das Zellinnere ermöglichen (NEWMAN et al., 2001). Auch durch Plasmid-DNA-beschichtete Goldpartikel, die von einer Heliumschockwelle angetrieben ins Gewebe geschossen werden („Gene gun“), kann eine bessere Transfektion erreicht werden (YANG und HUANG, 1996). Als Transporter für non-virale Vektoren können außerdem Liposomen fungieren. Es handelt sich um positiv geladene Partikel (kationische Liposomen), an die Plasmide gekoppelt werden und auf Grund ihrer elektrischen Ladung mit Zellmembranen in

Wechselwirkung treten können. Die elektrostatische Interaktion hat zur Folge, dass die Liposomen samt der DNA, die sie tragen, in die jeweilige Zelle aufgenommen werden (NIIDOME und HUANG, 2002). Da in dieser Studie die Zytokine mittels Magnetofektion anhand von paramagnetischen Nanopartikeln im betroffenen Gebiet gehalten werden, soll nun etwas näher auf diese Methode beim nonviralen Gentransfer eingegangen werden.

3.2.3. Magnetofektion

Um die Transfektionsrate der Plasmide in die Zielzellen zu erhöhen, werden die Plasmide zunächst im Verhältnis 1:1 mit superparamagnetischen Nanopartikeln gemischt und mit physiologischer Kochsalzlösung in Lösung gebracht. Diese Nanopartikel bestehen aus Eisenoxid, die zuvor mit Polyethylenimin (PEI), einem kationischen Polymer beschichtet wurden. Eisenoxidpartikel folgen einem magnetischen Gradienten und sind somit in einem magnetischen Feld lenkbar. Die Assoziation der Nanopartikel mit den Plasmiden basiert auf elektrostatische Interaktionen und auf einer Salz-induzierten Kolloidaggregation. Dieser Komplex zwischen Plasmid und Nanopartikel wird als Magnetofektin bezeichnet. Durch einen Neodymium-Eisen-Bor-Magneten (Nd-Fe-B-Magneten), der durch Klebestreifen über den Zielzellen fixiert wird, wird nach intratumoraler Injektion der Magnetofektine ein starkes magnetisches Feld aufgebaut, das die Magnetofektine genau dort festhält. Durch diese Methode sedimentieren die Magnetofektine schneller an den Zelloberflächen, ohne die endozytotische Aufnahme in die Zelle zu beeinflussen. Da die Transfektionsrate so um ein vielfaches gesteigert wird und die Vektormenge somit deutlich verringert werden kann, sinkt die Toxizität und die Wahrscheinlichkeit möglicher therapiebedingter Nebenwirkungen (SCHERER et al., 2002). In der in-vitro-Studie von SCHERER und Mitarbeitern wurde ein Nd-Fe-B Magnet über Zellkulturplatten positioniert und somit ein magnetischer Gradient erzeugt. Maximale Transfektionslevels werden bereits innerhalb der ersten 10 Minuten erreicht. In zwei weiteren Studien, die sich mit dem Gentransfer auf Endothel- bzw. Flimmerepithelzellen beschäftigt, konnte zudem gezeigt werden, dass sich die Transfektionsrate in-vitro auf das 360- bzw. auf das 2500- fache unter Anwendung der Magnetofektion steigern lässt (HUTH et al., 2004, KROTZ et al., 2003). WEI und Mitarbeiter fanden im Jahr 2004 an einem in-vitro-Modell heraus, dass die

Transfektionseffizienz nanopartikelassoziierter Genvektoren am größten ist, wenn DNA und Nanopartikel im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt werden. Unter Einfluss eines Magnetfeldes betrug die Transfektionsrate 51% versus 10% ohne magnetisches Feld (WEI et al., 2004). Auch in-vivo-Studien belegen die Effektivität der Transfektionssteigerung durch den Einsatz von Magnetofektinen und Magneten. SCHERER und Mitarbeiter verbrachten einen non-viralen Vektor als Magnetofektin in das Ileumlumen von Ratten und in die Ohrvenen von Schweinen. Im Einflussgebiet eines Nd-Fe-B Magneten konnte im Vergleich zum Kontrollgewebe eine Genexpression festgestellt werden (SCHERER et al., 2002). Auch KRÖTZ und Mitarbeiter können eine erhöhte Genexpression im Einflussgebiet eines Magneten nach intravenöser Applikation von Magnetofektinen bei Mäusen feststellen. Hierfür infundierten sie den Mäusen über einen Femoralkatheter die Magnetofektine und setzten den *Musculus cremaster* vier Minuten einem Magnetfeld aus. Im Bereich dieses Magnetfeldes konnte post mortem eine hohe Transfektionsrate nachgewiesen werden (KRÖTZ et al., 2003). Die Abbildungen 4 und 5 veranschaulichen das Prinzip der Magnetofektion.



Abbildung 4: Eisenhaltige Plasmid-DNA-Lösung

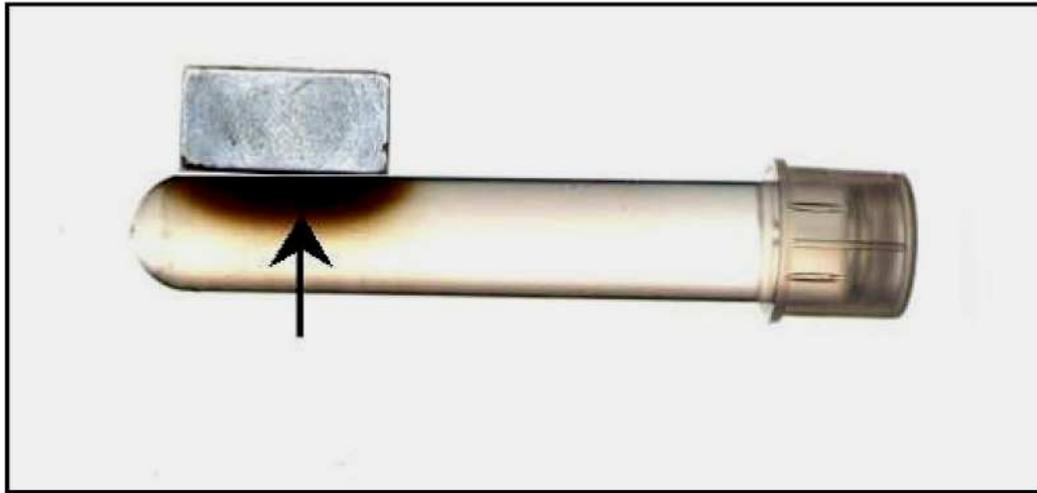


Abbildung 5: Konzentration der Plasmid-DNA-Lösung unter Einfluss des Neodymium-Eisen-Bor-Magneten

3.3. Zytokine

Die Zellen des Immunsystems sezernieren eine Vielfalt unterschiedlicher Zytokine, die für die Immunantwort und die Kommunikation untereinander von essentieller Bedeutung sind. Zytokine bestehen aus Glykoproteinen und wirken im Gegensatz zu Hormonen auf eine Vielzahl von Geweben und Zelltypen. Sie können autokrin, parakrin sowie endokrin ihre Wirkung entfalten. Obwohl sie strukturell einen ähnlichen Aufbau besitzen, unterscheidet man Interleukine, Interferone sowie Kolonie stimulierende Faktoren. Die Zytokinproduktion kann durch verschiedene Signale ausgelöst werden. Die wichtigsten Signale sind mit Abstand Antigene oder Antigen-MHC-Molekül-Komplexe, die an T- oder B-Zell-Rezeptoren gebunden sind. Daneben lösen auch Antigen-Antikörper-Komplexe, die an Fc-Rezeptoren binden, sowie Superantigene eine Zytokinproduktion aus (TIZARD, 2004). Die verschiedenen Zytokine können additive, antagonistische oder synergistische Wirkung zeigen und beeinflussen sich somit gegenseitig. Im Folgenden soll auf IL-2, IFN- γ und GM-CSF näher eingegangen werden, da diese Zytokine in der Arbeit Anwendung fanden.

3.3.1. Interleukin 2

IL-2 wird von T-Lymphozyten, vornehmlich von den CD4⁺-T-Lymphozyten, aber auch von CD8⁺-T-Lymphozyten und Large-granular-Lymphozyten (LGL)

gebildet und dient als wichtigster Wachstumsfaktor und Aktivator für T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Daneben kann IL-2 auch ohne Beteiligung von T-Helferzellen zu einer Bildung tumorspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten führen (FEARON et al., 1990) und Makrophagen sowie Oligodendrozyten aktivieren. Werden lymphoide Vorläuferzellen mit IL-2 inkubiert, reifen diese zu LAK-Zellen aus. LAK-Zellen besitzen ein hohes zytotoxisches Potential und sind somit befähigt, effektiv gegen Tumorzellen zu wirken (ROITT et al., 1995). IL-2 wird bei der Therapie von Nierenzelltumoren und bei der Therapie des malignen Melanoms als Monotherapie oder in Verbindung mit LAK-Zellen und anderen Zytokinen eingesetzt (ATKINS et al., 2000, ROSENBERG et al., 1989). Auch beim Fibrosarkom sind mit IL-2, wie bereits in Kapitel 1.5.4. erwähnt, verschiedene klinische Studien durchgeführt worden. Die Nebenwirkungen der Therapie mit IL-2 umfassen Fieber, Schüttelfrost, Schwindel, Vomitus und Diarrhoe, Hypotension und Flüssigkeitsretention, Minderdurchblutung innerer Organe, myokardiale Infarkte und insbesondere eine erhöhte Kapillarpermeabilität (EISNER et al., 2004, ELMSLIE et al., 1991, GONSALVES et al., 1991, SCHWARTZ et al., 2002). Die Ursache der erhöhten Gefäßpermeabilität, auch als *capillary leak syndrome* bezeichnet, sind bislang nicht eindeutig geklärt. Es wird diskutiert, ob der direkte Einfluss von IL-2 auf die Gefäßendothelzellen, oder die Aktivierung weiterer Zytokine und Entzündungsmediatoren zu einer gesteigerten Durchlässigkeit der Gefäße führt, oder ob die durch IL-2 induzierte Eosinophilie, mit anschließender Degranulation der entsprechenden Granulozyten diese Symptomatik verursacht (VAN HAELST PISANI et al., 1991). In Folge zeigen die Patienten Symptome, die sich über den Verlust von Flüssigkeit und Protein in interstitielle Gewebe erklären lassen. Hierzu zählen neben peripheren Ödemen, Pleura- und Perikard- und Bauchhöhlenergüssen auch die durch die Hypovolämie verursachten hypoxischen Schäden von Organen und Geweben (BALUNA und VITETTA, 1997).

3.3.2. Interferon γ (IFN- γ)

Interferon- γ als einziges Typ-II-Interferon ist nicht mit anderen Interferonen (Typ I) verwandt und wird nur wegen seiner antiviralen Wirkung als Interferon bezeichnet. Es wird von CD8- und von CD4+ T-Lymphozyten wie auch von NK-Zellen gebildet und zeichnet sich durch seine immunmodulatorische Wirkung auf

B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und Makrophagen aus. Die Homologie der Aminosäuresequenz zu humanem IFN- γ beträgt lediglich 63%. Wegen der daraus resultierenden speziesspezifischen Wirkung kann für eine immunstimulierende Gentherapie bei der Katze nur felines IFN- γ zum Einsatz kommen (ARGYLE et al., 1995). Um sich einer Immunantwort zu entziehen, haben Tumoren, wie bereits in Kapitel 2.4. besprochen, verschiedene Mechanismen entwickelt. Einer der Hauptmechanismen des *tumor escape* besteht in einer verminderten Expression von MHC-I-Molekülen auf der Tumoroberfläche, so dass Tumorantigene unzureichend dem Immunsystem präsentiert werden. IFN- γ veranlasst Zellen zu einer erhöhten Expression von Molekülen, die der Antigenpräsentation dienen (FARRAR et al., 1981). Tumorzellen werden somit demaskiert und sind nun dem Immunsystem zugänglich. Gleichzeitig werden CD4⁺-T-Lyphozyten angeregt, IL-2 und IL-2R zu bilden. Die Aktivität von NK-Zellen wird durch IFN- γ verstärkt. Diese reagieren unter anderem auch selber mit einer vermehrten Produktion von IFN- γ , so dass durch diese positive Rückkopplung weitere NK-Zellen aktiviert werden können. Zudem werden durch IFN- γ Makrophagen aktiviert, die daraufhin vermehrt phagozytierte Mikroorganismen zerstören (TIZARD, 2004) und durch die Freisetzung weiterer Zytokine, wie beispielsweise IL-12, zellvermittelte Prozesse aktivieren (BLATTMANN und GREENBERG, 2004). Als Nebenwirkungen, die bei einer Therapie mit IFN- γ auftreten können, sind grippeähnliche Symptome wie Fieber, Abgeschlagenheit und Anorexie zu nennen. Diese werden vermutlich durch sekundär freigesetzte Fieber-Mediatoren wie IL-1, PGE2 und TNF ausgelöst. Daneben werden aber auch neurologische und renale Toxizitäten sowie myelosuppressive Effekte beobachtet (AUL und SCHNEIDER, 1997).

3.3.3. Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

GM-CSF wird von T-Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet und wirkt als Wachstumsfaktor hauptsächlich auf Vorläuferzellen der myeloiden Zellreihe (TIZARD, 2004). GM-CSF stimuliert die Reifung und Ausdifferenzierung der myeloiden Vorläuferzellen und verlängert zudem deren Überlebenszeit (METCALF, 1986). Neben seiner Fähigkeit die Proliferation von Granulozyten und Makrophagen zu fördern, ist GM-CSF auch

an der Proliferation, Ausreifung und Migration von Monozyten und dendritische Zellen beteiligt (DUNHAM und BRUCE, 2004). Die ausgereiften APC können in Tumorgebiete einwandern und dort ihrer Funktion, Tumorzellfragmente dem Immunsystem zu präsentieren, nachkommen. Wie auch bei IFN- γ wird auch durch die Wirkung von GM-CSF die Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen hoch reguliert und somit die T-Zell-vermittelte Immunantwort über eine gesteigerte Antigenpräsentation hochreguliert (ARMITAGE, 1998, FISCHER et al., 1988). Durch GM-CSF werden zudem neutrophile Granulozyten angezogen, so dass die Funktion der APC gestützt wird. Gleichzeitig wird die phagozytotische und zytotoxische Aktivität von Monozyten und Makrophagen gesteigert. Durch GM-CSF wird zudem die Produktion anderer Zytokine, wie IL-1, IL-6 und TNF gesteigert, was wiederum das Wachstum und die Differenzierung von T- und B-Lymphozyten fördert. Zu den beschriebenen Nebenwirkungen zählen lokale Hautreaktionen am Injektionsort, Knochenschmerzen wie auch grippeähnliche Symptome (BUCHSEL et al., 2002).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Studiengrundlagen

1.1. Aufbau der Studie

Bei der Studie handelt es sich um eine prospektive, klinische Phase-II-Studie, in der zum einen die Wirksamkeit und zum anderen die Toxizität einer adjuvanten Gentherapie in der Behandlung des feline Fibrosarkoms untersucht wird.

In der 2007 von JAHNKE et al. durchgeführten Phase-I-Studie wurde mittels einer Dosisescalation die Plasmidmenge von jeweils 450 µg, die für die feline Zytokine GM-CSF, IFN- γ und IL-2 kodieren, zur intratumoralen adjuvanten Anwendung in der Therapie von feline Fibrosarkomen als sicher beurteilt. In der vorliegenden Studie soll anhand eines größeren Patientenkollektivs neben der Ermittlung der Effektivität ein besonderes Augenmerk auf das Auftreten von möglichen Nebenwirkungen und Toxizitäten bei der adjuvanten immunstimulierenden Gentherapie mit feIL-2, feIFN- γ und feGM-CSF gelegt werden. Hierzu wurden 20 Katzen zweimalig adjuvant zur Standardtherapie mit einer festgelegten modifizierten Dosis von 150 µg feIL-2, 450 µg feIFN- γ und 750µg feGM-CSF der aufgeführten Zytokine präoperativ behandelt und mit einer klinikeigenen Kontrollgruppe, die nur die Standardtherapie einer radikalen Tumorexstirpation erhielt, verglichen. Die auftretenden Nebenwirkungen bei der Therapie- und bei der Kontrollgruppe wurden in einer Veterinary Co-operative Oncology Group - Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE)-Tabelle aufgeführt und statistisch ausgewertet. Die Patientenbesitzer wurden erst nach Abschluss der Studie informiert, ob ihre Katze die adjuvante Gentherapie erhalten hatte oder nicht. Nur auf diese Weise konnte gewährleistet werden, dass die Besitzer unvoreingenommen und unbeeinflusst den Vorbericht erstatten.

1.2. Patientengut

Die an der Studie teilnehmenden Katzen stammen ausschließlich aus Privathaushalten. Um ein ausreichendes Patientenaufkommen zu sichern, wird an

zahlreiche niedergelassene Tierärzte im Einzugsgebiet von München ein Informationsschreiben mit der Bitte zur Überweisung geeigneter Patienten geschickt (Anhang 1). Die Internetpräsenz www.fibrosarkom.de gibt zudem Patientenbesitzern und Tierärzten Informationen rund um die Studie. Zum Anderen konnten einige Studienteilnehmer aus der Onkologiesprechstunde der Medizinischen Kleintierklinik der Universität München rekrutiert werden. Insgesamt werden 40 Katzen ausgewertet, von denen 20 neben der Standardtherapie eine adjuvante immunstimulierende Gentherapie mit Plasmiden, die für feIL-2, feIFN- γ und feGM-CSF kodieren, erhalten. Der Einfachheit halber werden die Katzen, die die adjuvante Therapie erhalten als Therapiegruppe und jene, die nur die Standardtherapie erhalten als Kontrollgruppe bezeichnet. Die Katzen der Therapiegruppe erhalten zudem 14 (Tag -14) und 7 (Tag -7) Tage vor der Tumorexstirpation jeweils adjuvant die Gentherapie mit den für die feline Zytokine GM-CSF, IFN- γ und IL-2 kodierenden Plasmide intratumoral appliziert. Bei der Erstvorstellung werden alle Patientenbesitzer ausführlich über den Verlauf, die Studienhintergründe und mögliche Nebenwirkungen der Gentherapie sowie über das mit der Operation in Zusammenhang stehende Narkoserisiko aufgeklärt. Von dem betreuenden Tierärzteteam wurde zudem in einem persönlichen Gespräch auf Fragen seitens der Besitzer eingegangen. Zudem wurden die Besitzer informiert, dass die für die Behandlung anfallenden Kosten, bei einer regelmäßigen Vorstellung der Katzen, zu den Untersuchungsterminen vom Forschungsprojekt getragen werden. Im Anschluss an das Gespräch erhielten die Patientenbesitzer ein Informationsblatt auf dem die wichtigsten Informationen zur Studie noch einmal kurz zusammengefasst sind (Anhang 2) sowie eine Übersicht, wann die Kontrolluntersuchungen stattzufinden haben (Anhang 3). Nach einer schriftlichen Einverständniserklärung seitens der Besitzer (Anhang 4) erfolgte die Aufnahmeuntersuchung der Katzen, die über die endgültige Aufnahme entschied.

1.3. Ein- und Ausschlusskriterien

Um an der Studie teilzunehmen, mussten folgende Punkte erfüllt werden (Einschlusskriterien):

- Der Tumor musste als Fibrosarkom befundet werden.

- Es musste eine vom Besitzer unterschriebene Einverständniserklärung vorliegen.
- Das Tier musste, abgesehen von der Tumorerkrankung, eine Lebenserwartung von mindestens einem Jahr haben.
- Der Tumor musste am Rumpf lokalisiert sein.
- Der Tumor musste in einer Sitzung chirurgisch entfernt werden können.

Der Patient durfte nicht in die Studie aufgenommen werden, wenn einer der folgenden Punkte zutraf (Ausschlusskriterien):

- Das Tier hatte innerhalb des letzten Jahres mit einer Radio-, Gen- oder Chemotherapie erhalten.
- Das Tier ist innerhalb der letzten sechs Wochen vor Studieneintritt mit einem Kortikosteroid oder einem anderen immunsupprimierenden Medikament behandelt worden.
- Es lag eine andere Tumorerkrankung oder Tumormetastasen vor.
- Das Tier war trächtig.
- Das Tier war hochgradig aggressiv, so dass mehrfache Injektionen ein zu großes Risiko für das Tier und den behandelten Tierarzt darstellten.
- Es lag ein positiver FIV- oder FeLV-Test vor.

1.4. Nachträgliche Ausschlusskriterien

Trafen einer oder mehrere der folgenden Punkte innerhalb des laufenden Studienjahrs zu, wurde das Tier nachträglich aus der Studie ausgeschlossen:

- Die pathohistologische Untersuchung ergab, dass der exstirpierte Tumor kein Sarkom war.
- Die Anwendung von Kortikosteroiden oder anderen immunsupprimierenden Medikamenten innerhalb der ersten sechs Wochen nach Behandlungsbeginn.
- Keine Komplianz von Seiten des Besitzers

2. Studienablauf

2.1. Zeitlicher Ablauf

Die Katzen der Therapiegruppe erhielten zweimalig präoperativ in einwöchigem Abstand eine intratumorale Genterapie. Der Operationstag wird als Tag 1 definiert. Die Katzen der Therapiegruppe wurden das erste Mal an Tag -14 zur Aufnahmeuntersuchung vorgestellt. Durfte die Katze an der Studie teilnehmen, erhielt sie bereits an diesem Tag die erste Injektion der Genterapie. In der Folgewoche an Tag -7 erfolgte dann die zweite Medikamentenapplikation. Die Katzen wurden bereits einen Tag vor der Tumorexstirpation (Tag 0) stationär aufgenommen und für den Operationstag (Tag 1) vorbereitet. Um die Prognose nicht durch die Wartezeit ohne therapeutische Maßnahmen zu verschlechtern, wurde bei den Katzen der Kontrollgruppe aus ethischen Gründen von der Gabe eines Placebos abgesehen. Deshalb wurden sie gleich am Folgetag nach der Aufnahmeuntersuchung operiert. Demzufolge wird in beiden Gruppen der Tag vor der Operation als Tag 0 definiert. Sowohl an den Tagen der Genterapie, als auch während des gesamten klinischen Aufenthaltes standen die Katzen unter gründlicher und regelmäßiger medizinischer Überwachung und wurden vom selben Tierärzteam betreut. Die Katzen verblieben, soweit keine Komplikationen zu verzeichnen waren, bis einen Tag nach der Operation (Tag 2) in stationärem Aufenthalt und wurden dann nach Hause entlassen. Alle an der Studie teilnehmenden Tiere wurden an zuvor definierten Tagen zu den ambulanten Kontrollterminen einbestellt. Dabei bezog sich der Tag der Nachuntersuchung immer auf den Operationstag als Tag 1. Die Nachuntersuchungstermine wurde bei beiden Gruppen für die Tage 14, 45, 90, 180, 270 *post operationem* angesetzt. Die Abschlussuntersuchung erfolgte an Tag 360. Tabelle 1 gibt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der Studie:

Tabelle 1: Überblick über den zeitlichen Ablauf der Studie für Therapie- und Kontrollgruppe

Tag	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
-14	Aufnahmeuntersuchung (inkl. Blutbild, Blutserumanalyse, Röntgen, Ultraschall), 1. intratumorale Injektion, Magnetofektion	
-7	2. intratumorale Injektion, Magnetofektion	
0	Stationäre Aufnahme (inkl. Blutbild, Blutserumanalyse)	Aufnahmeuntersuchung (inkl. Blutbild, Blutserumanalyse, Röntgen, Ultraschall), stationäre Aufnahme
1	Operation	Operation
2	Postoperative Untersuchung (inkl. Blutbild), Entlassung	Postoperative Untersuchung (inkl. Blutbild), Entlassung
14	Kontrolluntersuchung (inkl. Blutbild, Blutserumanalyse) Fäden ziehen	Kontrolluntersuchung (inkl. Blutbild, Blutserumanalyse) Fäden ziehen
45, 90, 180, 270	Kontrolluntersuchung (inkl. Blutbild, Blutserumanalyse)	Kontrolluntersuchung (inkl. Blutbild, Blutserumanalyse)
360	Abschlussuntersuchung (inkl. Blutbild, Blutserumanalyse, Röntgen, Ultraschall)	Abschlussuntersuchung (inkl. Blutbild, Blutserumanalyse, Röntgen, Ultraschall)

2.2. Aufnahmeuntersuchung

Die an Tag -14 und Tag 0 durchgeführte Aufnahmeuntersuchung beinhaltete eine eingehende klinische Untersuchung, eine spezielle Untersuchung, eine umfassende Röntgen- und Ultraschalluntersuchung sowie eine Blutuntersuchung, zu der neben einem großen Blutbild und einem großen Organprofil auch ein

Schilddrüsenprofil sowie ein FIV/FeLV-Test eingeleitet wurde. Des Weiteren wurde vom Tumor ein Feinnadelaspirat entnommen, gefärbt und zytologisch ausgewertet. Die Ergebnisse aller Untersuchungen wurden auf einem vorgefertigten Formblatt genau dokumentiert. Die genauen Abläufe und Hintergründe aller durchgeführten Untersuchung werden im Folgenden genauer erläutert.

2.2.1. Allgemeine Untersuchung

Bei der Allgemeinen Untersuchung wurde neben dem Verhalten und dem Habitus die Körpertemperatur, das Gewicht, der Ernährungszustand, die Schleimhautfarbe, die kapillare Rückfüllzeit, der Hautturgor, die Herzfrequenz und Auskultation, die Atemfrequenz und Lungenauskultation, die Palpation des Abdomens, die Palpation der Mandibular- und Popliteallymphknoten sowie die Palpation der Schilddrüse beurteilt.

2.2.2. Spezielle Untersuchung

Bei der speziellen Untersuchung wurde der Tumor mit einer Schieblehre in drei Dimensionen vermessen. Wenn der Maximaldurchmesser kleiner oder gleich 2 cm gemessen hat, wurde er der Tumorgroße „klein“ zugeordnet. Maß er mehr als 2 cm wurde er als großer Tumor eingestuft. Zusätzlich wurden die Tumoren aufgrund ihres Tumorstatus (Primärtumor oder Rezidivtumor) eingeteilt. Die folgenden Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Zuordnung der Tumoren nach Tumorstatus und Tumorgroße.

Tabelle 2: Einteilung der Tumoren nach Tumorstatus

	Primärtumor	Tumorrezidiv
Alle Tumorabmessungen ≤ 2 cm	Primärtumor klein	Rezidiv klein
Eine Tumorabmessung > 2 cm	Primärtumor groß	Rezidiv groß

Des Weiteren wurde die Lokalisation des Tumors, die Tumorbeschaffenheit sowie die Operabilität erfasst und dokumentiert. Bestanden Bedenken bezüglich der Operabilität, wurde Herr Prof. Köstlin als Chirurg zu Rate gezogen und dem Patientenbesitzer gegebenenfalls zu einer präoperativen computertomographischen Untersuchung des Tumorausmaßes geraten.

2.2.3. Röntgenuntersuchung

Zum Ausschluss von Metastasen in der Lunge und anderen zugrundeliegenden Erkrankungen wurden Röntgenaufnahmen vom Brustkorb angefertigt. Hierfür wurde der Thorax in drei Ebenen geröntgt, jeweils eine rechts- und eine links-anliegende Aufnahme im latero-lateralen Strahlengang sowie eine Aufnahme im ventro-dorsalen Strahlengang. Bei unklaren Befunden wurde zu einer computertomographischen Untersuchung des Thorax geraten.

2.2.4. Ultraschalluntersuchung

Um auch Metastasen in inneren Organen oder andere nicht klinisch erkennbare schwere Organerkrankungen auszuschließen, wurde zudem bei der Aufnahmeuntersuchung eine Ultraschalluntersuchung vom Abdomen durchgeführt. Hierbei wurden die einzelnen Organe, wie die Harnblase, die Nieren, die Milz, die Leber, der Magen, die Pankreasregion und das Darmkonvolut mit den dazugehörigen Lymphknoten genau beurteilt.

2.2.5. Blutuntersuchungen

Jede Neuaufnahme beinhaltete eine ausführliche Blutuntersuchung der Katzen. Hierzu wurden mit Hilfe einer Kanüle (Mikrolance™; Becton Dickinson, Madrid, Spanien) jeweils 1-2 ml Vollblut in zwei 2-ml-Kalium-Ethylendiamintetraacetat (2ml-K-EDTA) beschichteten Röhrchen (Sarstedt; Nümbrecht; Deutschland) und 2-3 ml Serum in einem 5-ml-Serumröhrchen (Sarstedt; Nümbrecht; Deutschland) aus der *Vena cephalica antebrachii* oder der *Vena saphena* entnommen und anschließend im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der Universität München untersucht. Aus dem Vollblut wurden mittels eines vollautomatischen Hämatologiegerätes (Cell-Dyn®; 3500 R; Abbott Laboratories; Chicago; Illinois,

USA) die folgenden Parameter bestimmt: Erythrozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobingehalt, mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), mittleres Erythrozytenvolumen (MCV), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), Thrombozyten- und Gesamtleukozytenzahl. Das Differentialblutbild mit der Anzahl der neutrophilen, eosinophilen sowie basophilen Granulozyten, der Monozyten und der Lymphozyten wurde anhand eines Blutausstrichs mikroskopisch ausgezählt.

Aus dem Serum wurden mit Hilfe eines automatischen Blutchemieanalysators (Automatic Analyser Hitachi® 911; Roche Diagnostics; Indianapolis, Indiana; USA) die Aspartat-Amino-Transferase (AST), die Alkalische Phosphatase (AP), Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß, Albumin, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, Serungallensäuren, Thyroxin (T4) sowie die Elektrolyte Phosphat, Chlor, Natrium, Kalium und Calcium ermittelt. Des Weiteren wurden aus dem Serum ein FIV-Antikörpertest sowie ein FeLV-Antigentest durchgeführt. Das Vollblut des verbleibenden EDTA-Röhrchens wurde bei 4000 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert, das so gewonnene Plasma abgetrennt und bei -80 °C für weitere Analysen asserviert.

2.3. Intratumorale Injektion und Magnetofektion

Die Katzen der Therapiegruppe erhielten zweimalig, jeweils 14 und 7 Tage vor der Operation, eine intratumorale Injektion mit dem aus Plasmiden und Nanopartikeln bestehenden Gemisch. Hierfür wurden zunächst die Plasmide in der zuvor angegebenen Dosierung in physiologische Kochsalzlösung gebracht. Die Nanopartikel wurden mit Wasser für Injektionszwecke in Lösung gebracht und anschließend im Verhältnis 1:1 mit der Plasmidlösung vermischt. Das Injektionsvolumen entsprach 500 µl.

Zur Herstellung der Plasmide wurden in einer vorausgegangenen Studie von SCHWARZ und Mitarbeitern im Jahr 2007 die Gene, die für feII-2, feIFN- γ und feGM-CSF kodieren, aus feline mononukleären Zellen isoliert und mit Hilfe des Zytomegalieviruspromotors in Expressionsplasmide kloniert. Diese Expressionsplasmide gelten als Ursprungsplasmide für die Plasmidproduktion. Die Herstellung der Plasmide erfolgte durch die Plasmid Factory GmbH und Co; KG (Bielefeld, Deutschland) in einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration

von 5,0 mg Plasmiden auf 1,0 Milliliter Wasser.

Die für die Studie benötigten, mit Polyethylenimin (PEI) umhüllten Eisenoxidnanopartikel wurden von der Chemicell GmbH (Berlin, Deutschland) produziert. Sie wurden in einer wässrigen Lösung in einer Konzentration von 60 mg Nanopartikel auf einen Milliliter Wasser hergestellt.

Aufgrund der negativen Ladung der Plasmide und der positiven Ladung der mit PEI umhüllten Nanopartikel kommt es zur Ausbildung elektrostatischer Anziehungskräfte, die die beiden Komponenten miteinander verbinden (SCHERER et al., 2002).

Um das für die Magnetofektion benötigte Magnetfeld aufzubauen wurde nach der intratumoralen Injektion auf dem Tumor ein Neodymium-Eisen-Bor-Magnet (Neo Delta Magnet NE 2010; IBS Magnet; Berlin; Deutschland) mit einem Klebeband befestigt und für eine Stunde dort belassen. In dieser Zeit standen die Katzen unter sorgfältiger Beobachtung, um möglich auftretenden Nebenwirkungen sofort entgegenwirken zu können.

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen den Neodymium-Eisen-Bor-Magneten vor und während der Magnetofektion.

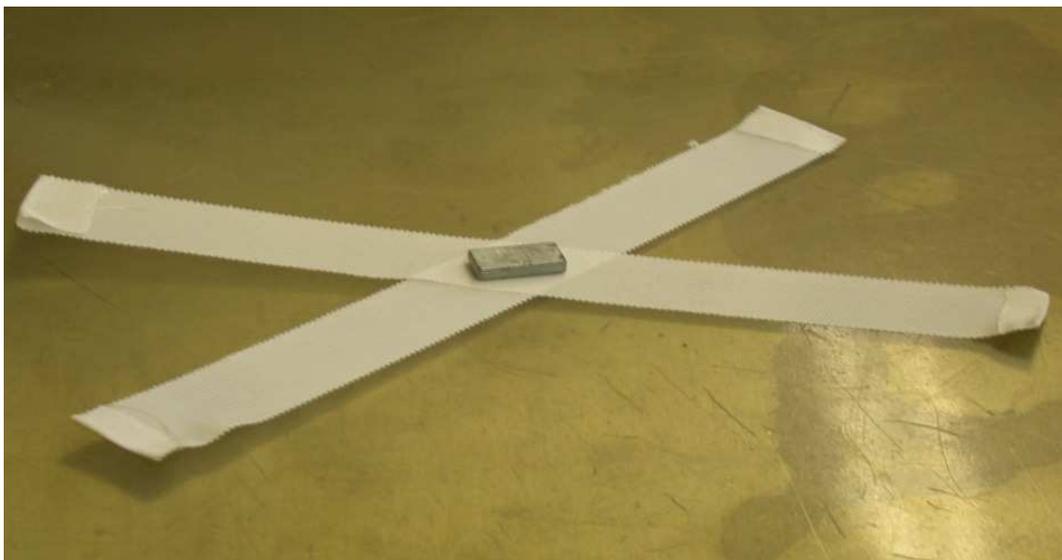


Abbildung 6: Neodymium-Eisen-Bor-Magnet auf einem Klebeband. Aus dem Fotoarchiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München.

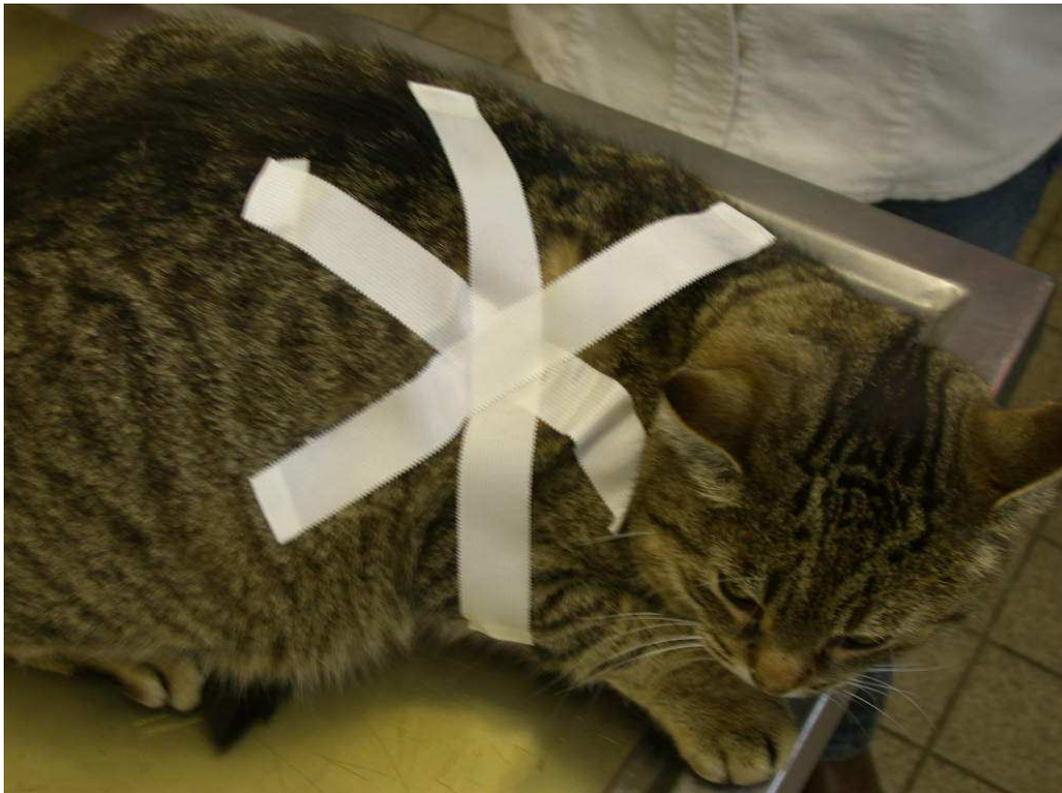


Abbildung 7: Neodymium-Eisen-Bor-Magnet während der Magnetofektion auf dem Tumor einer Katze. Aus dem Fotoarchiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München.

2.4. Operationsvorbereitung, Anästhesie und Medikamente

Die Katzen beider Gruppen wurden einen Tag vor der Operation (Tag 0) stationär aufgenommen und in Boxen der Intensivstation untergebracht. Allen Katzen wurde ein venöser Venenverweilkatheter (Vasofix®; B.Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland) in die *Vena cephalica antebrachii* oder in die *Vena saphena* gelegt über den sie während des gesamten Klinikaufenthalts Medikamente und die Infusionstherapie zur Flüssigkeitssubstitution erhalten. Wies die Katze zudem eine andere Erkrankung auf, wurden entsprechende Vorsichtsmaßnahmen getroffen und ihr die benötigten Medikamente oder bei Bedarf eine zusätzliche Therapie verabreicht. Die Katzen bekamen während des gesamten Klinikaufenthaltes klinikeigenes Futter. Am Abend vor der Operation wurde das Futter aus den Boxen entfernt. So konnte sichergestellt werden, dass die Katzen am Tag der Operation nüchtern sind. Zur antibiotischen Versorgung erhielten die Katzen Amoxicillin-Clavulansäure (Augmentan®, GlaxoSmithKline;

Beecham Pharma; München) in einer Dosierung von 12,5 mg/kg KGW (Körpergewicht) zweimal täglich intravenös appliziert. Zur Analgesie wurde den Katzen je nach Größe und zu erwartender Schmerzhaftigkeit der Operation Buprenorphin (Temgesic®; Essex; München; Deutschland) in einer Dosierung von 0,005 - 0,01 mg/kg KGW einmalig vor der Operation intravenös verabreicht. Die Narkoseeinleitung erfolgte in der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München und beinhaltete 0,2 mg/kg KGW Midazolam (Dormikum®; Roche; Grenzach-Whylen; Deutschland) und 4,0 - 6,0 mg/kg KGW Propofol (Rapinivet®; Essex Pharma; München; Deutschland). Sobald die narkotisierende Wirkung eintrat, wurde der Katze ein intratrachealer Tubus gelegt und sie wurde zur Narkoseerhaltung an eine Inhalationsnarkose angeschlossen. Diese beinhaltete Sauerstoff (Medizinischer Sauerstoff®; Linde; Höllriegelskreuth; Deutschland) und Isofluran (IsoBa®; Essex Pharma; München; Deutschland), das je nach Wirkung zwischen 1,0 und 3,0 % dosiert wurde. Das Fell um den Tumor wurde großflächig abrasiert und das Operationsfeld gründlich gesäubert und desinfiziert.

2.5. Operation

Sowohl die Katzen der Kontrollgruppe, als auch die der Therapiegruppe, wurden in der Chirurgischen und Gynäkologischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München vom gleichen Chirurgen- und Anästhesistenteam betreut. Bei der Operation wurde zunächst die Haut um den Tumor ellipsoid aufgeschnitten und der Tumor *en bloc*, wenn möglich mit einem seitlichen Abstand von 3 cm im gesunden Gewebe und einer Muskelschicht Sicherheitsabstand in die Tiefe, exstirpiert. Falls sich der Tumor in unmittelbarer Nachbarschaft zu knöchernen Strukturen, wie Rippen oder Wirbelfortsätzen befand wurden diese mitentfernt. Der entnommene Tumor wurde *cranial* mit einem Faden markiert. Nachdem Proben für das Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München entnommen und Tumorabkratzpräparate angefertigt worden sind, wurden die Schnittränder mit Tusche angefärbt und in ein Gefäß mit 4-%-igem Formalin gelegt. Der so fixierte Tumor konnte anschließend im Institut für Tierpathologie der LMU München histopathologisch untersucht werden.

2.6. Zytologie und histopathologische Untersuchungen

Die nach der Operation angefertigten Tumorabkratzpräparate wurden nach einer modifizierten Wright-Färbung im Labor der Medizinischen Kleintierklinik gefärbt und anschließend zytologisch ausgewertet. Das Institut für Tierpathologie der Universität München übernahm die histopathologische Untersuchung der Tumoren.

2.7. Nachsorge

Noch in Narkose wurde den Katzen bei Bedarf ein Druckverband angelegt um so einer möglichen Serom- oder Hämatombildung präventiv entgegenzuwirken. Sobald die Katzen extubiert werden konnten, wurden sie zurück auf die Intensivstation der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München gebracht. Waren die Operationswunden sehr schmerzhaft, erhielten die Katzen zu ihrer vorgesehenen Schmerztherapie von drei mal täglich 0,01 mg/kg KGW Buprenorphin (Temgesic®; Essex; München; Deutschland) zudem 20-30 mg/kg KGW Metamizol (Vetalgin®; Intervet Unterschleißheim, Deutschland) einmalig intravenös appliziert. Im Tagesverlauf erhielten die Katzen eine intravenöse Flüssigkeitssubstitution mit 50-60 ml/kg einer Ringer-Lactat-Infusionslösung (B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland), was dem einfachen Tagesbedarf entspricht. Alle Katzen erhielten während ihres gesamten Klinikaufenthaltes zweimal täglich eine antibiotische Versorgung mit Amoxicillin-Clavulansäure (Augmentan®; GlaxoSmithKline; München; Deutschland) in einer Dosierung von 12,5 mg/kg KGW. Im Verlauf des Tages und auch am Folgetag wurden die Katzen mehrmals eingehend klinisch untersucht, um eventuell auftretende Komplikationen frühzeitig zu erkennen. Am Abend wurde den Katzen Futter in kleinen Mengen angeboten. Nach der klinischen Untersuchung, einer venösen Blutentnahme zur Anfertigung eines Blutbildes mit Differentialblutbild, einer genauen Beurteilung des Wundgebietes mit Verbandswechsel sowie der Entnahme des Venenverweilkatheters, wurden die Katzen am Nachmittag des darauffolgenden Tages (Tag 2) nach Hause entlassen. Die Patientenbesitzer führten die weitere antibiotische, sowie die analgetische Versorgung ihrer Katze selbstständig zu Hause durch. Dazu gaben sie zur antibiotische Versorgung für weitere 5 Tage zweimal täglich 12,5 mg/kg KGW Amoxicillin-Clavulansäure

(Synulox®, Pfizer; Karlsruhe; Deutschland) und zur analgetischen Versorgung am ersten Tag 0,2 mg/kg KGW Meloxicam (Metacam®; Boeringer Ingelheim; Ingelheim; Deutschland) oral ein. Die Dosis des Analgetikums wurde an den Folgetagen um die Hälfte reduziert. Die Besitzer wurden angehalten, sich bei auftretenden Problemen oder Fragen zu melden.

2.8. Kontrolluntersuchungen

Die Kontrolluntersuchungen dienten der frühzeitigen Erkennung von Rezidiven oder anderen Auffälligkeiten. Bei der Therapie- und der Kontrollgruppe erfolgten die Kontrolluntersuchungen jeweils an Tag 14, 45, 90, 180, 270 und 360. Bei jeder dieser Untersuchungen wurden die Katzen zunächst sorgfältig klinisch untersucht. Im Anschluss erfolgte die spezielle Untersuchung, in der das Operationsgebiet gründlich adspektorisch und palpatorisch durchgemustert wurde. An Tag 14 wurden zudem die Fäden gezogen. In der an allen Kontrollterminen durchgeführten Blutuntersuchung wurde ein Blutbild mit Differentialbild angefertigt und eine Blutserumanalyse durchgeführt. Bestand der Verdacht, dass ein Tumorrezidiv vorliegt, wurde ein Feinnadelaspirat der auffälligen Struktur entnommen und zytologisch ausgewertet. Bestätigte sich der Verdacht eines Rezidivs, war für die Katzen die Studie beendet. Bestanden keine Auffälligkeiten und lag kein Rezidiv vor, wurden die Katzen bis zum nächsten Kontrollbesuch nach Hause entlassen. Die Besitzer wurden zudem angehalten das Operationsgebiet gut zu beobachten und bei einem Rezidivverdacht einen Termin außerhalb der regulär festgelegten Termine zu vereinbaren.

2.9. Abschlussuntersuchung

An Tag 360 wurden die Katzen das letzte Mal im Rahmen der Studie vorgestellt. Zu diesem Termin erfolgten neben den Untersuchungen, die auch bei den normalen Kontrollterminen durchgeführt werden, einige zusätzliche diagnostische Untersuchungen. Hierzu zählte eine Ultraschalluntersuchung des Abdomens, in der, wie bereits in der Aufnahmeuntersuchung, die einzelnen Organe der Bauchhöhle durchgemustert wurden. Des Weiteren wurde auch der Thorax erneut in 3 Ebenen geröntgt. Die Röntgenaufnahmen umfassten eine rechts- sowie eine

linksanliegende Aufnahme im latero-lateralen Strahlengang sowie eine Aufnahme im ventro-dorsalen Strahlengang. Nur anhand dieser Untersuchungen konnte sichergestellt werden, dass Metastasen oder andere Erkrankungen nicht übersehen werden.

3. Studienauswertung

3.1. Auswahl der Kontrollgruppe

Die 20 Katzen der Kontrollgruppe wurden nachträglich anhand der Tumorgröße und anhand des Tumorstatus (Primärtumor oder Rezidiv) der Therapiegruppe aus einem historischen studieneigenen Patientenkollektiv ausgewählt. Tumoren die in einer Dimension größer als 2 cm maßen wurden hier als groß definiert. Somit beinhaltete jede Gruppe 7 Tiere mit einem großen und 6 Tiere mit einem kleinen Primärtumor, sowie jeweils 2 Tiere mit einem großen und 5 Tiere mit einem kleinen Rezidivtumor. Es soll hierbei betont werden, dass bei der Auswahl der Kontrollen die Tumorgröße und der Tumorstatus als einzige Entscheidungskriterien ausschlaggebend waren. Da genau diese Kriterien von essentieller, prognostischer Bedeutung sind, konnte auf diese Weise die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen sichergestellt werden.

3.2. Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe

Neben der Auswahl der Kontrollgruppe anhand der oben genannten prognostischen Faktoren wurde geprüft, ob die beiden Gruppen auch in Bezug auf das Alter und das Gewicht der Tiere sowie der Tumorlokalisation miteinander verglichen werden können.

Für die Parameter Alter und Gewicht wurde zunächst mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests untersucht, ob eine Normalverteilung vorliegt. Der T-Test für unabhängige Stichproben vergleicht die Mittelwerte beider Gruppen miteinander.

Für die Prüfung, ob die beiden Gruppen hinsichtlich des Parameter Tumorlokalisation miteinander vergleichbar sind, wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet.

Für alle Tests wurde ein p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant definiert. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe einer statistischen Software der Firma SPSS (SPSS ® Version 18; SPSS Incorporation; Chicago; Illinois; USA).

3.3. Auswertung der Nebenwirkungen

Um Nebenwirkungen bei der Erprobung neuer Medikamente und neuer Therapieformen von Krebspatienten einheitlich beurteilen zu können, wurde vom *National Cancer Institute* (NCI) 1982 die *erste common toxicity criteria* (CTC)-Tabelle herausgegeben. Seitdem werden vom NCI zwei neue Versionen veröffentlicht. Im März 1999 die Version 2.0 und im Dezember die Version 3.0, die der CTC-Tabelle den neuen Namen *common terminology criteria for adverse events* (CTCAE) gibt. In dieser Arbeit wird die aktuellste Version zur Auswertung verwendet. Beurteilungsparameter, die nicht in der Tabelle zu finden waren, wurden selbst definiert. Die CTCAE-Tabelle dient dazu, mögliche Nebenwirkungen zu erfassen und diese einem zuvor definierten Schweregrad zuzuordnen. Dabei werden die Nebenwirkungen den folgenden Gradstufen zugeordnet:

Grad 1: Geringfügig vorübergehende Nebenwirkung, der gemessene Parameter liegt außerhalb des Referenzbereichs, keine Behandlung erforderlich.

Grad 2: Mäßige Nebenwirkung, die durch eine schwach therapeutische Intervention gemildert werden kann.

Grad 3: Schwerwiegende Nebenwirkung, der gemessene Parameter liegt deutlich außerhalb des Referenzbereichs. Ein therapeutisches Eingreifen und eine eventuelle stationäre Aufnahme sind erforderlich.

Grad 4: Lebensbedrohliche Nebenwirkung, der gemessene Parameter liegt weit außerhalb des Referenzbereichs. Eine stationäre Aufnahme ist unumgänglich.

Grad 5: Tod des Patienten

Anhang 5 zeigt die VCOG-CTCAE-Tabelle mit den berücksichtigten Untersuchungsparametern und der Zuordnung in Schweregrade.

Um beurteilen zu können, ob die beobachtete Nebenwirkung mit der Therapie in Verbindung gebracht werden kann, wurden die Schweregrade der einzelnen Nebenwirkungen der Therapiegruppe für die einzelnen Tage mit denen der Kontrollgruppe verglichen und mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests statistisch ausgewertet. Hierbei wurden jeweils die Untersuchungsparameter des Tag -14 der Therapiegruppe mit denen des Tag 0 der Kontrollgruppe (beides Tag der Aufnahmeuntersuchung), sowie die Tage 14 und 45 beider Gruppen miteinander verglichen.

Zusätzlich wurden innerhalb der Therapiegruppe die Untersuchungsparameter des Tag -14 mit denen von den Tagen -7, 0, 14 und 45 mit Hilfe des Wilcoxon-Tests miteinander verglichen.

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

3.4. Auswertung der Effektivität

Die Überprüfung der Effektivität der Therapie erfolgt anhand einer Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche. Als statistisches Testverfahren wird hierfür der Log-Rank-Test verwendet. Die Tiere beider Gruppen werden vom Tag 1 bis zum Tag 360 *post operationem* beobachtet. Das zu untersuchende Ereignis wird als das Auftreten eines Rezidivs definiert. Die Kaplan-Meier-Kurve liefert zudem eine bildliche Übersicht über das Rezidivverhalten der Tumore beider Gruppen innerhalb des Untersuchungszeitraums.

Es wird ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant definiert. Die Berechnung und die Anfertigung der Grafik der Kaplan-Meier-Funktion erfolgt mit der statistischen Software der Firma SPSS (SPSS Version 18; SPSS Incorporation; Chicago Illinois; USA).

IV. ERGEBNISSE

1. Stammdaten der Studientiere

Für die Phase-II-Studie wurden 20 Katzen mit einem Fibrosarkom in der Medizinischen Kleintierklinik der Universität München vorgestellt. Alle Katzen erfüllten die Aufnahmekriterien und können somit an der Studie teilnehmen. Das Alter der Tiere lag zum Aufnahmezeitpunkt zwischen zwei und sechzehn Jahren mit einem Durchschnittsalter von 10,8 Jahren. Das durchschnittliche Gewicht betrug 5,2 Kilogramm. Die meisten der Tumoren waren an typischen Impfstellen lokalisiert. Bei 10 Katzen befand sich der Tumor interscapulär oder caudal des Interscapularraums, bei 3 Katzen an der linken, bei 6 Katzen an der rechten Brustwand, sowie bei einer Katze an der rechten Bauchwand. Bei den Tumoren handelte es sich bei 13 Katzen um Primärtumoren, von denen 7 als groß und 6 als klein eingestuft wurden. Bei den verbleibenden 7 Rezidivtumoren handelte es sich um 2 große und 5 kleine. Der Übersicht wegen werden im Folgenden die Stammdaten der Tiere in einer Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 5: Stammdaten der Therapiegruppe

Patient	Alter	Rasse	Geschlecht	Tumorstatus und Tumorgroße	Tumor-Abmessung	Tumor-Lokalisation	Rezidivfreie Zeit
1	12 J	EKH	Wk	Primärtumor klein	1,9 x 2,1 x 1,5 cm	Interscapulär	> 360 Tage
2	11 J	EKH	Mk	Rezidiv groß	3,0 x 2,5 x 2,0 cm	Brustwand links	42 Tage
3	12 J	EKH	Mk	Primärtumor groß	3,0 x 3,3 x 3,5 cm	caudal der Scapulae	280 Tage
4	14 J	EKH	Mk	Rezidiv klein	1,0 x 1,3 x 0,7 cm	caudal der Scapulae	91 Tage
5	12 J	EKH	Wk	Primärtumor groß	2,2 x 2,5 x 1,5 cm	caudal der Scapulae	> 360 Tage
6	5 J	EKH	Mk	Primärtumor klein	1,7 x 2,0 x 1,9 cm	Brustwand links	> 360 Tage
7	11 J	EKH	Wk	Primärtumor groß	2,8 x 2,7 x 2,1 cm	Brustwand rechts	> 360 Tage
8	14 J	Langhaar	Mk	Primärtumor groß	2,4 x 2,8 x 1,9 cm	Interscapulär	> 360 Tage
9	6 J	EKH	Mk	Rezidiv groß	3,6 x 2,4 x 2,8 cm	caudal der Scapulae	> 360 Tage
10	2 J	EKH	Wk	Primärtumor klein	1,4 x 1,5 x 1,5 cm	Bauchwand rechts	> 360 Tage
11	13 J	EKH	Mk	Primärtumor klein	1,8 x 2,0 x 2,0 cm	Interscapulär	350 Tage

12	9 J	EKH	Mk	Rezidiv klein	1,5 x 1,3 x 1,3 cm	Brustwand rechts	175 Tage
13	16 J	EKH	Mk	Primärtumor groß	2,6 x 1,8 x 1,5 cm	Brustwand rechts	182 Tage
14	14 J	EKH	Wk	Primärtumor klein	1,1 x 1,2 x 1,0 cm	Brustwand rechts	> 360 Tage
15	12 J	EKH	Wk	Primärtumor groß	2,5 x 3,7 x 1,6 cm	Brustwand rechts	266 Tage
16	8 J	EKH	Wk	Rezidiv klein	1,0 x 1,0 x 1,0 cm	Interscapulär	126 Tage
17	7 J	EKH	Mk	Rezidiv klein	1,7 x 1,3 x 1,7 cm	Brustwand links	92 Tage
18	12 J	EKH	W	Primärtumor klein	1,9 x 1,9 x 1,9 cm	Interscapulär	184 Tage
19	10 J	EKH	Mk	Primärtumor groß	4,0 x 2,8 x 1,7 cm	Interscapulär	42 Tage
20	15 J	EKH	Mk	Rezidiv klein	1,8 x 2,0 x 1,6 cm	Brustwand rechts	126 Tage

2. Stammdaten der historischen Kontrollgruppe

Die 20 Katzen der Kontrollgruppe wurden nachträglich anhand der Tumorgröße und anhand des Tumorstatus (Primärtumor oder Rezidiv) der Therapiegruppe aus einem historischen, studieneigenen Patientenkollektiv ausgewählt. Somit wurden jeder Gruppe 7 Tiere mit einem großen und 6 Tiere mit einem kleinen Primärtumor, sowie jeweils 2 Tiere mit einem großen und 5 Tiere mit einem kleinen Rezidiv zugeordnet. Tumorgröße und Tumorstatus sind mitunter die wichtigsten prognostischen Faktoren und wurden gewählt, um die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen zu gewährleisten.

Tabelle 6: Zuordnung der Kontrollgruppe anhand des Tumorstatus.

	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
Großer Primärtumor	7	7
Kleiner Primärtumor	6	6
Großer Rezidivtumor	2	2
Kleiner Rezidivtumor	5	5
Groß: wenn eine Abmessung > 2 cm		

Die Katzen der Kontrollgruppe unterlagen den gleichen Aufnahmekriterien, wurden vom selben Chirurgen operiert und bei den Follow-up-Terminen den gleichen Untersuchungen unterzogen wie die Katzen der Therapiegruppe. Das

Alter der Katzen der Kontrollgruppe lag zwischen einem und siebzehn Jahren. Das Durchschnittsalter betrug dabei 10,6 Jahre. Das durchschnittliche Gewicht lag bei 4,8 Kilogramm am Tag der Erstvorstellung. Auch von den Tieren der Kontrollgruppe wurden die Stammdaten im Folgenden kurz zusammengefasst:

Tabelle 7: Stammdaten der Kontrollgruppe

Patient	Alter	Rasse	Geschlecht	Tumorstatus und Tumorgroße	Tumor-Abmessung	Tumor-Lokalisation	Rezidivfreie Zeit
1	7 J	EKH	Wk	Primärtumor groß	2,0 x 2,0 x 4,0 cm	Interscapulär	21 Tage
2	14 J	EKH	Mk	Rezidiv klein	0,5 x 0,5 x 0,5 cm	Rechte Brustwand	30 Tage
3	17 J	EKH	Mk	Primärtumor klein	1,5 x 1,5 x 1,5 cm	Brustwand links	60 Tage
4	1 J	EKH	Wk	Primärtumor klein	1,7 x 1,5 x 1,0 cm	Brustwand rechts	> 360 Tage
5	15 J	EKH	Mk	Rezidiv groß	2,5 x 2,0 x 2,0 cm	Brustwand rechts	60 Tage
6	14 J	Perser	Wk	Rezidiv groß	4,0 x 3,0 x 2,0 cm	Brustwand rechts	90 Tage
7	6 J	EKH	Mk	Primärtumor groß	4,0 x 2,0 x 2,0 cm	Interscapulär	> 360 Tage
8	17 J	EKH	Mk	Primärtumor klein	2,0 cm x 2,0 x 2,0 cm	Brustwand links	> 360 Tage
9	12 J	EKH	Mk	Primärtumor klein	0,9 x 1,2 x 1,5 cm	Interscapulär	> 360 Tage
10	8 J	Russ. Blau	Wk	Rezidiv klein	0,8 x 0,8 x 0,8 cm	Bauchwand Rechts	45 Tage
11	13 J	EKH	Mk	Primärtumor klein	0,8 x 1,0 x 1,5 cm	Brustwand rechts	> 360 Tage
12	5 J	EKH	Wk	Primärtumor groß	2,5 x 3,4 x 2,5 cm	Interscapulär	196 Tage
13	9 J	EKH	Mk	Primärtumor klein	0,9 x 1,5 x 1,5 cm	Interscapulär	325 Tage
14	9 J	EKH	Mk	Rezidiv klein	1,9 x 1,5 x 1,5 cm	Brustwand links	84 Tage
15	7 J	EKH	Wk	Primärtumor groß	2,1 x 0,9 x 1,0 cm	Interscapulär	> 360 Tage
16	10 J	EKH	Wk	Primärtumor groß	4,1 x 4,0 x 2,5 cm	Brustwand rechts	172 Tage
17	14 J	EKH	Wk	Rezidiv klein	0,8 x 0,9 x 0,6 cm	Brustwand links	34 Tage
18	10 J	EKH	Wk	Primärtumor groß	3,0 x 2,6 x 2,2 cm	caudal der Scapulae	272 Tage
19	8 J	EKH	Wk	Primärtumor groß	2,5 x 2,8 x 3,0 cm	Bauchwand rechts	> 360 Tage
20	11 J	EKH	Wk	Rezidiv klein	1,6 x 1,6 x 1,0 cm	Bauchwand links	180 Tage

3. Deskriptive Statistik

Bei der deskriptiven Statistik wird geprüft, ob die beiden Gruppen hinsichtlich des Alters, des Gewichtes und der Tumorlokalisierung miteinander vergleichbar sind. Nur wenn die Vergleichbarkeit gewährleistet ist, sind explorative Statistiken sinnvoll.

3.1. Alter

Zunächst wurde geprüft, ob das Alter der Katzen einer Normalverteilung folgt. Hierfür wurde der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest verwendet. Die asymptotische Signifikanz lieferte einen p-Wert von 0,439 und bestätigte somit die Normalverteilung der beiden Gruppen. Abbildung 8 zeigt die Grafik der Normalverteilung.

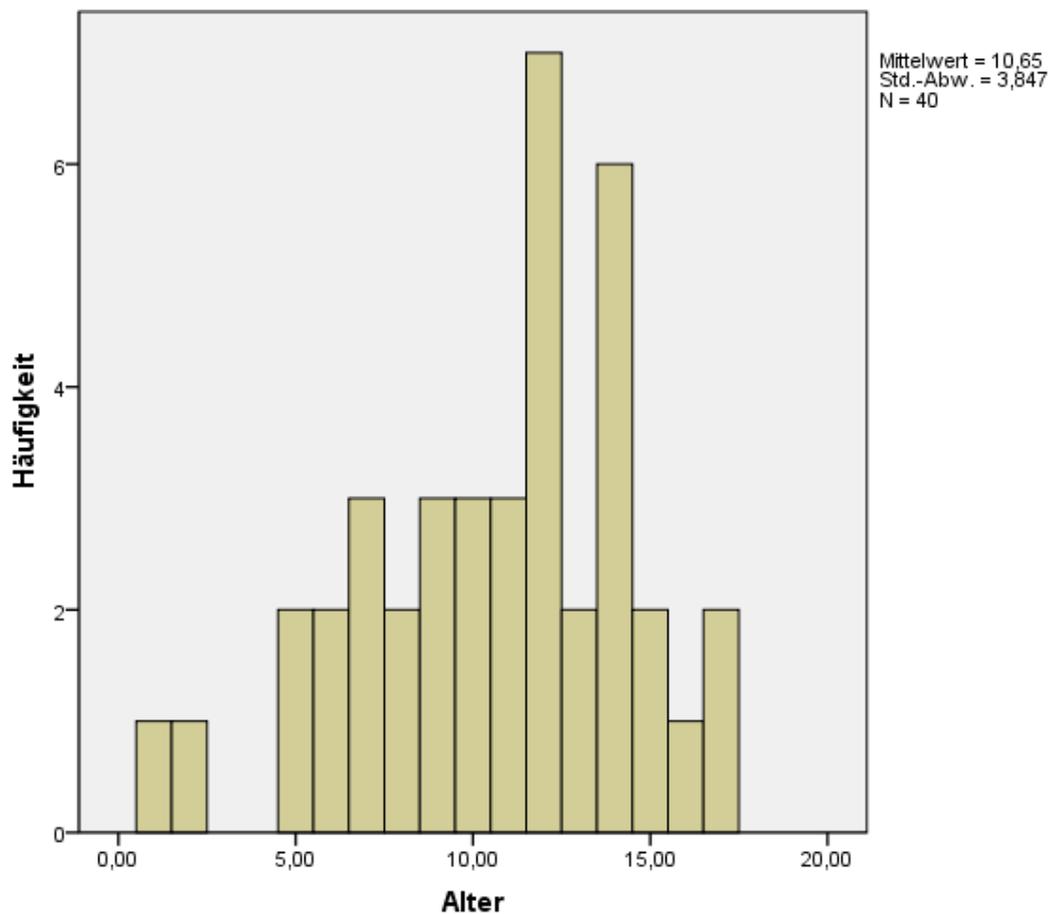


Abbildung 8: Graphik des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest (Alter)

Die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen in Bezug auf das Alter wurde durch den T-Test bei unabhängigen Stichproben mit einem p-Wert von 0,872 bestätigt.

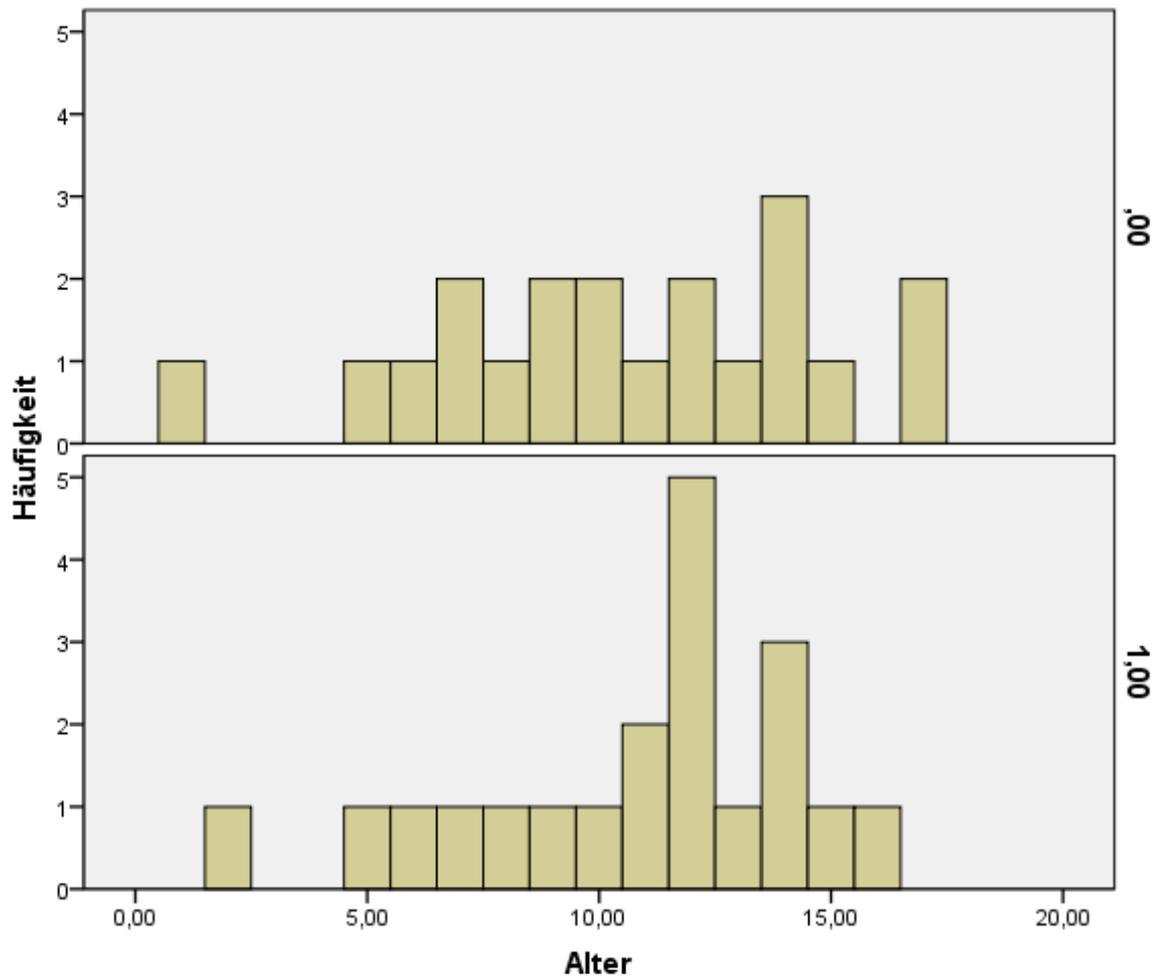


Abbildung 9: Grafik des T-Test bei unabhängigen Stichproben (Alter)

Kontrollgruppe = 0

Therapiegruppe = 1

3.2. Gewicht

Der Kolmogorov-Smirnov-Test erbrachte einen p-Wert von 0,875 und zeigte somit, dass die beiden Gruppen im Parameter Gewicht eine Normalverteilung aufwiesen.

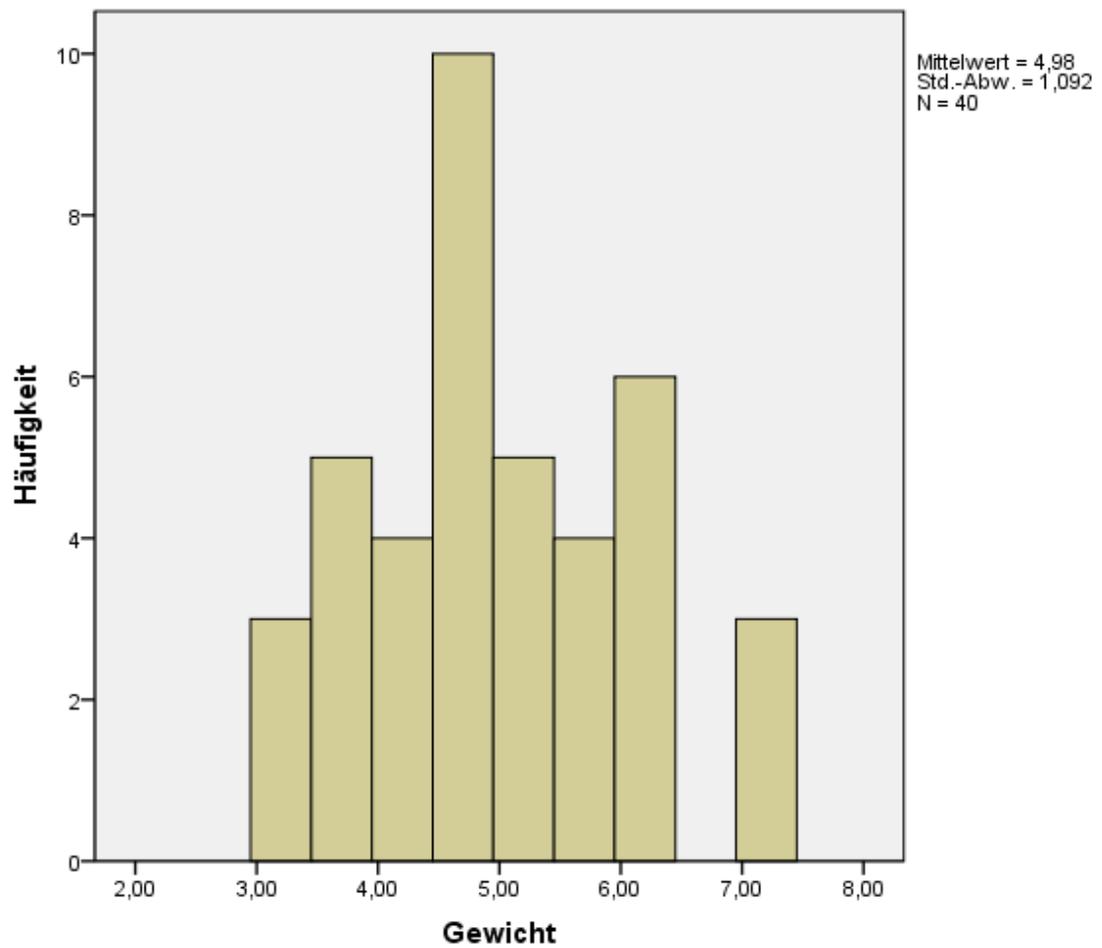


Abbildung 10: Grafik des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest (Gewicht)

Der T-Test bei unabhängigen Stichproben ergab einen p-Wert von 0,296 und zeigte somit, dass die beiden Gruppen im Parameter Gewicht miteinander vergleichbar sind.

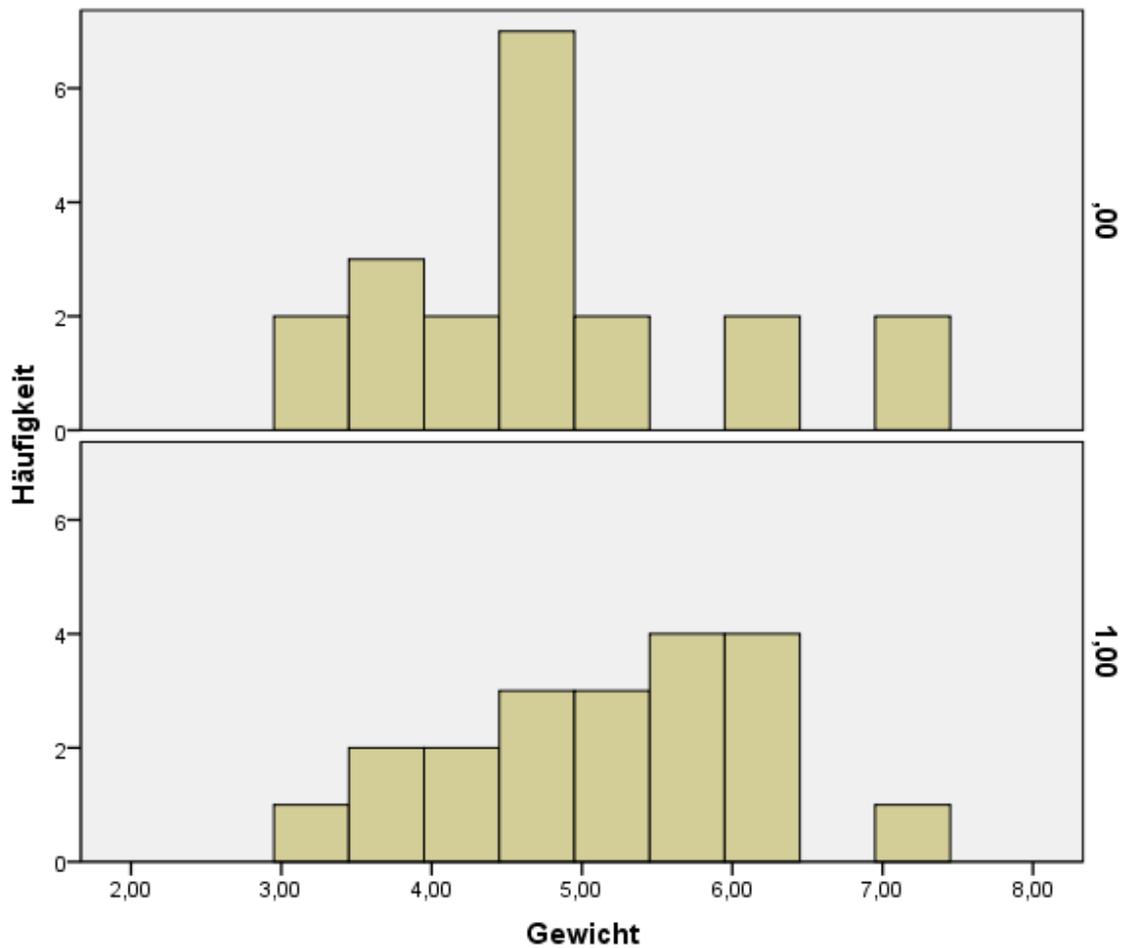


Abbildung 11: Grafik des T-Test bei unabhängigen Stichproben (Gewicht)

Kontrollgruppe =0

Therapiegruppe =1

3.3. Tumorlokalisierung

In der folgenden Übersichtstabelle wird gezeigt, wo die einzelnen Tumoren der Katzen lokalisiert waren:

Tabelle 10: Übersicht der Tumorlokalisierung bei Therapie- und Kontrollgruppe

	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
Interscapulär	10	7
Brustwand rechts	6	7
Brustwand links	3	4
Bauchwand rechts	1	1
Bauchwand links	0	1

Der Chi-Quadrat-Test ergibt einen p-Wert von 0,782. Dies belegt, dass die beiden Gruppen auch hinsichtlich der Tumorlokalisation vergleichbar sind.

4. Explorative Statistik

In der explorativen Statistik sollen die Effektivität sowie die Toxizität und mögliche Nebenwirkungen der adjuvanten Gentherapie untersucht werden. Sie dient dazu, Hypothesen zu bestätigen oder zu widerlegen, wie auch neue Erkenntnisse zu gewinnen.

4.1. Toxizität und Nebenwirkungen

Die Tabelle 11 bietet eine Übersicht darüber, welchem Schweregrad die unterschiedlichen Nebenwirkungen der Therapiegruppe in der VOG-CTCAE-Tabelle an den Tagen -14, -7, 0, 14 und 45 zugeordnet werden konnten. Die Zahlen geben die Häufigkeit an, mit welcher ein Untersuchungsparameter zu einem bestimmten Grad verändert auftritt.

Tabelle 11: Beobachtungen innerhalb der Therapiegruppe

Nebenwirkung	d -14 (n= 20)				d -7 (n= 20)				d 0 (n = 20)			
	Grad				Grad				Grad			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Erythrozyten												
Hämoglobin												
Hämatokrit	2				2				1			
Leukozytopenie	3	2			2	1			3	1		
Leukozytose					1				1			
Lymphozytopenie	3	1	3		3	3	2		5			
Lymphozytose	1				1				2			
Eosinophilie	6				5				5			
Basophilie	1	1							1			
Monozytose	2				2				1			
Stabkernige Neutrophilie	1				1							
Segmentkernige Neutrozytose	1											
Thrombozytopenie	2											
Thrombozytose					1				1			
Albumin												

Lethargie	1	1
Vomitus	2 1	1
Infizierte Wundheilungsstörungen	1	
Nicht infizierte Wundheilungsstörungen	1	

Die nächste Übersichtstabelle stellt die entsprechenden veränderten Untersuchungsparameter der Kontrollgruppe dar. Die Auswertung erfolgte an den Tagen 0, 14 und 45, da dieser Gruppe die Vorlaufzeit von zwei Wochen *prae operationem* fehlt. Aufgrund eines anderen Untersuchungsprotokolls in der Vergangenheit konnten die Daten von fünf Tieren an Tag 45 nicht erhoben werden.

Tabelle 12: Beobachtungen innerhalb der Kontrollgruppe

Nebenwirkung	d 0 (n= 20)				d 14 (n= 20)				d 45 (n = 15)			
	Grad				Grad				Grad			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Erythrozyten												
Hämoglobin					1				1			
Hämatokrit					1				1			
Leukozytopenie	5	5			5	2	1		4			
Leukozytose	1				1							
Lymphozytopenie	1	4	2		1	3	2				2	
Lymphozytose	1				1				2			
Eosinophilie	2				3				2			
Basophilie	2	1			1				1			
Monozytose	2	1			1				2			
Stabkernige Neutrophilie	1											
Segmentkernige Neutrozytose	2			1	4	2						
Thrombozytopenie												
Thrombozytose					1				1			
Albumin												
AST					1							
Bilirubin						1						
Kreatinin									1			
Glukose	7				4				3	1		
Allergische Reaktionen												
Anorexie					1				1			
Diarrhoe					1				1			
Dyspnoe												
Fieber					1							

Gewichtsverlust		3	1
Konstipation			1
Lethargie		1	2
Vomitus			
Infizierte Wundheilungsstörungen		3	2
Nicht infizierte Wundheilungsstörungen		2	1

4.1.1. Blutbildveränderungen

Zur Auswertung der Blutbildveränderungen wurden sowohl das weiße, wie auch das rote Blutbild untersucht.

4.1.1.1. Hämoglobinabfall

Eine Katze der Therapiegruppe zeigte an Tag 14 und zwei Katzen der Kontrollgruppe zeigen an Tag 14 und Tag 45 einen Hämoglobinabfall des Grad 1. Die Tabelle 13 zeigt, dass weder innerhalb der Gruppe noch im Gruppenvergleich der entsprechenden Tage ein signifikanter Unterschied zu finden ist.

Tabelle 13: Hämoglobinabfall

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	1,000
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	1,000
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,000
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,9892
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,9442

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.1.2. Hämatokritabfall

In der Therapiegruppe konnte beim Vergleich der Tage -14 und 14 ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Hämatokritabfalls festgestellt werden. Beim Vergleich der beiden Gruppen untereinander liegt der p-Wert an Tag 14 bei 0,0601, also knapp oberhalb der statistischen Signifikanz.

Tabelle 14: Hämatokritabfall

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	1,000
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,034
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,7972
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,0601
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,9303

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.1.3. Leukozytopenie

Weder im Vergleich der beiden Gruppen miteinander, noch im Vergleich der einzelnen Tage innerhalb der Therapiegruppe konnte eine statistische Signifikanz in Bezug auf eine Leukozytopenie ermittelt werden.

Tabelle 15: Leukozytopenie

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,083
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,480
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,257
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,1595
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,4171
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,6119

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.1.4. Leukozytose

Zwei Katzen der Therapiegruppe wiesen an Tag 14 eine Leukozytose des Grades 3, zwei weitere eine Leukozytose des Grades 1 auf, während in der Kontrollgruppe nur bei einer Katze eine Leukozytose des Grades 1 festzustellen war. Wie in Tabelle 16 zu sehen ist, ist konnte dennoch keine statistische Signifikanz aufgezeigt werden.

Tabelle 16: Leukozytose

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,063
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,7972
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,4094
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	1,0

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.1.5. Lymphozytopenie

Sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der Therapiegruppe ließen sich an allen Untersuchungstagen Lymphozytopenien bis hin zum Grad 3 feststellen. Weder im Vergleich der Gruppen untereinander, noch im Vergleich der einzelnen Tage der Therapiegruppe konnte jedoch eine statistische Signifikanz ermittelt werden.

Tabelle 17: Lymphozytopenie

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,855
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,222
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,726
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,8498
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,9569
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,3913

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.1.6. Lymphozytose

Weder im Vergleich der Gruppen miteinander, noch im Vergleich der einzelnen Tage der Therapiegruppe kann beim Parameter Lymphozytose eine statistische Signifikanz verzeichnet werden.

Tabelle 18: Lymphozytose

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,564
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,7972
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,4094
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	1,0

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.1.7. Eosinophilie

Die Erhöhung der eosinophilen Granulozyten der Katzen in der Therapiegruppe war meist dem Grad 1 zuzuordnen und es ließ sich keine statistische Signifikanz zwischen den beiden Gruppen, sowie im Vergleich der einzelnen Tage der Therapiegruppe errechnen.

Tabelle 19: Eosinophilie

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,655
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,655
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,564
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,180
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,2853
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,9784
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,137

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.1.8. Basophilie

Im Therapieverlauf konnte bei der Therapiegruppe kein Anstieg der basophilen Granulozyten beobachtet werden. Wie in Tabelle 20 ersichtlich, konnte auch beim Vergleich der beiden Gruppen keine statistische Signifikanz hinsichtlich der Basophilen nachgewiesen werden.

Tabelle 20: Basophilie

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,180
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,785
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,414
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,414
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,8077
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,9892
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,9303

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.1.9. Monozytose

In Tabelle 21 ist zu erkennen, dass keine statistische Signifikanz beim Vergleich der beiden Gruppen miteinander und beim Vergleich der einzelnen Tage in der Therapiegruppe in der Anzahl der Monozyten vorlag.

Tabelle 21: Monozytose

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,564
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,157
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,7769
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,5979
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,495

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.1.10. Stabkernige Neutrophilie

Bereits an den Tagen -14 und -7 konnten bei jeweils einer Katze der Therapiegruppe eine Erhöhung der stabkernigen Neutrophilen dem Schweregrad 1 zugeordnet werden. Drei Katzen der Therapiegruppe wiesen zudem an Tag 14 eine stabkernige Neutrophilie vom Grad 1 auf. Weder zwischen den Tagen der Therapiegruppe, noch zwischen den Tagen von Therapie- und Kontrollgruppe war ein statistisch signifikanter Unterschied zu berechnen.

Tabelle 22: Stabkernige Neutrophilie

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,157
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,9892
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,4249
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	1,0

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.1.11. Segmentkernige Neutropenie

Eine Katze der Kontrollgruppe zeigte an Tag 0 im Blutbild eine verminderte Anzahl der segmentkernigen Neutrophilen, die dem Schweregrad 4 zuzuordnen ist. Am selben Tag konnte in der Kontrollgruppe bei zwei weiteren Katzen eine segmentkernige Neutropenie Grad 1 nachgewiesen werden, in der Therapiegruppe hingegen nur bei einer. An Tag 14 zeigten zwei Katzen eine segmentkernige Neutropenie Grad 2, sowie vier weitere Katzen eine segmentkernige Neutropenie Grad 1, während in der Therapiegruppe nur bei drei Katzen eine milde segmentkernige Neutropenie vom Grad 1 ermittelt werden konnte. Beim Vergleich der Gruppen miteinander konnte rechnerisch keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

Tabelle 23: Segmentkernige Neutropenie

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,157
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,5885
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,3793
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,6366

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.1.12. Thrombozytenveränderungen

Die Tabellen 24 und 25 lassen erkennen, dass keine statistische Signifikanz hinsichtlich der Thrombozytenzahlen berechnet werden konnte. So wiesen zwei Katzen der Therapiegruppe an Tag -14 eine Thrombozytopenie auf, die dem Schweregrad 1 zuzuordnen war. An Tag -7 und 0 konnte bei jeweils einer Katze der Therapiegruppe eine Thrombozytose Grad 1 ermittelt werden, an Tag 14 bei zwei Katzen.

Tabelle 24: Thrombozytopenie

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,157
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,157
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,157
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,157
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,5979
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	1,0
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	1,0

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

Tabelle 25: Thrombozytose

Thrombozytose	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,157
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,0
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,7972
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,7396

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.2. Veränderungen im Serumprofil

4.1.2.1. Erhöhung der Serum-Aspartat-Amino-Transferase-Aktivität

Keine der Therapiekatzen zeigte eine Erhöhung der Aspartat-Amino-Transferase-Aktivität. Eine Katze der Kontrolltiergruppe zeigte an Tag 14 eine Erhöhung der Aspartat-Amino-Transferase-Aktivität, die dem Grad 1 zugeordnet werden konnte. Es liegt keine statistische Signifikanz vor.

Tabelle 26: Erhöhung der Serum-Aspartat-Amino-Transferase-Aktivität

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,0
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,7972
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	1,0

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.2.2. Erhöhung der Kreatininkonzentration

Fünf der 20 Therapietiere wiesen bei Erstvorstellung an Tag -14 eine Erhöhung der Kreatininkonzentration auf. Diese war in allen Fällen dem Schweregrad 1 zuzuordnen. Der Vergleich mit dem Tag 45 innerhalb der Therapiegruppe erbrachte eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,046. An Tag 45 konnte nur bei einer Katze eine Kreatininkonzentrationserhöhung dem Schweregrad 1 zugeordnet werden. Es konnte jedoch keine statistische Signifikanz beim Vergleich der Therapiegruppe an Tag -14 mit der Kontrollgruppe an Tag 0 beobachtet werden. Auch die restlichen Vergleiche erbrachten rechnerisch keine statistische Signifikanz.

Tabelle 27: Erhöhung der Kreatininkonzentration

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,046
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,1806
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,4249
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,9303

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.2.3. Erhöhung der Bilirubinkonzentration

Eine Grad-1-Bilirubinämie konnte in der Therapiegruppe bei zwei Tieren an Tag -7 und bei einem Tier jeweils an Tag 14 und 45 festgestellt werden. In der Kontrollgruppe zeigte nur eine Katze eine Bilirubinämie des Schweregrades 2 an Tag 14 *post operationem* auf. Trotzdem ließ sich rechnerisch beim Vergleich der Gruppen miteinander, sowie beim Vergleich der Untersuchungstage der Therapiegruppe keine statistische Signifikanz ermitteln.

Tabelle 28: Erhöhung der Bilirubinkonzentration

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,157
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,0
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	1,0
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,8201

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.2.4. Erhöhung der Blutglukosekonzentration

Sowohl in der Therapie-, als auch in der Kontrollgruppe waren zu allen Untersuchungszeitpunkten milde Erhöhungen der Blutglukosekonzentrationen zu verzeichnen. Die meisten waren dem Schweregrad 1 zuzuordnen. Beim Vergleich der beiden Gruppen, sowie der einzelnen Untersuchungstage der Therapiegruppe miteinander konnte in Bezug auf die Blutglukosekonzentration kein statistischer signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Tabelle 29: Erhöhung der Blutglukosekonzentration

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,414
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,257
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,180
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,9353

d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,7972
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,8065

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.3. Anamnestiche und klinisch fassbare Nebenwirkungen

4.1.3.1. Allergische Reaktionen

An Tag -7 erleideten 2 der Therapiekatzen eine allergische Reaktion, die dem Grad 1 zugeordnet wurde.

Tabelle 30: Allergische Reaktionen

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,157
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,0
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	1,0
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	1,0

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.3.2. Anorexie

An Tag 14 zeigten 4 Katzen der Therapiegruppe eine Anorexie des Grades 1. Im Vergleich zu Tag -14, an dem keine der Katzen ein anorektisches Verhalten aufwiesen, ist hier mit einem p-Wert von 0,046 ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Beim Vergleich des Tags 14 mit dem der Kontrollgruppe, konnte jedoch keine statistische Signifikanz hinsichtlich des anorektischen Verhaltens abgelesen werden.

Tabelle 31: Anorexie

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,083
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,046
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	1,0

d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,0
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,4397
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,743

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.3.3. Diarrhoe

Keine der Katzen in der Therapiegruppe zeigte im Untersuchungszeitraum ein Anzeichen auf Diarrhoe. Allerdings konnte bei der Kontrollgruppe an den Tagen 14 und 45 jeweils Diarrhoe im Schweregrad 1 nachgewiesen werden. Es lag jedoch keine statistische Signifikanz vor.

Tabelle 32: Diarrhoe

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,0
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,7895
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,743

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.3.4. Dyspnoe

In der Therapiegruppe wies eine Katze bei Erstvorstellung an Tag -14 Dyspnoe auf, die dem Schweregrad 1 zugewiesen werden konnte. Weder bei der Therapiegruppe noch bei der Kontrollgruppe konnte zu einem weiteren Zeitpunkt ein Anzeichen für Dyspnoe festgestellt werden. Es lag keine statistische Signifikanz bei dem Vergleich mit der Therapiegruppe zu den anderen Untersuchungsdaten und auch keine bei dem Vergleich zur Kontrollgruppe am Tag 0 vor.

Tabelle 33: Dyspnoe

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,317

d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,8004
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	1,0
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	1,0

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.3.5. Fieber

An Tag -14 wiesen vier Katzen der Therapiegruppe eine Körpertemperaturerhöhung Grad 1 auf. An Tag -7 war bei keiner der Katzen eine Temperaturerhöhung zu messen. Im Vergleich konnte ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,046 festgestellt werden. Vergleicht man die Therapie- mit der Kontrollgruppe bei Erstvorstellung, bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich einer Körpertemperaturerhöhung.

Tabelle 34: Fieber

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,046
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,655
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,180
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	0,292
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,8112
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,8128

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.3.6. Gewichtsverlust

An Tag 14 zeigten zwei Tiere der Therapiegruppe einen Gewichtsverlust vom Schweregrad 1, vier weitere einen Gewichtsverlust vom Schweregrad 2. Rechnerisch konnte ein statistisch signifikanter Unterschied beim Vergleich mit Tag -14, dem Aufnahmetag der Therapiekatzen ermittelt werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe lag, wie in Tabelle 35 zu sehen ist, kein statistisch signifikanter Unterschied vor.

Tabelle 35: Gewichtsverlust

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,023
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,0
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,5091
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,743

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.3.7. Konstipation

Lediglich eine Katze der Therapiegruppe zeigte an Tag -7 eine milde Konstipation, die dem Grad 1 zugeordnet wurde. Im Vergleich der einzelnen Tage der Therapiegruppe miteinander, wie auch im Gruppenvergleich kam keine statistische Signifikanz zustande.

Tabelle 36: Konstipation

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,0
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	1,0
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,743

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.3.8. Lethargie

Am Tag -7 zeigten sechs Katzen der Therapiegruppe eine Lethargie vom Grad 1; am Tag 0 zeigten nur drei Katzen eine Lethargie desselben Grades. Vergleicht man den Tag -14 mit dem Tag 7, lässt sich rechnerisch ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,014 ermitteln. Da es für die Kontrollgruppe im Studienprotokoll keinen Tag -7 vor der Tumorexstirpation gibt, konnte auch kein Vergleich mit der Kontrollgruppe angestellt werden.

Tabelle 37: Lethargie

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	0,014
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	0,083
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,0
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	1,0
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,6753

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.3.9. Vomitus

Zwei Katzen der Therapiegruppe zeigten an Tag 14 Vomitus des Grades 1, eine weitere Katze des Grades 2. Trotzdem konnte weder im Vergleich mit Tag -14 der Therapiegruppe, noch im Gruppenvergleich eine statistische Signifikanz in diesem Parameter ermittelt werden.

Tabelle 38: Vomitus

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,0
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,4314
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,8128

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.3.10. Nicht-infizierte Wundheilungsstörungen

Wie in Tabelle 39 zu sehen ist, konnte rechnerisch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen und innerhalb der Therapiegruppe ermittelt werden.

Tabelle 39: Nicht-infizierte Wundheilungsstörungen

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,0
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,6032
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,5004

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.1.3.11. Infizierte Wundheilungsstörungen

Weder im Vergleich der einzelnen Tage der Therapiegruppe, noch im Gruppenvergleich, konnte eine statistische Signifikanz hinsichtlich des Entstehens von infizierten Wundheilungsstörungen errechnet werden.

Tabelle 40: Infizierte Wundheilungsstörungen

	p- Wert
d -14 (T) im Vergleich zu d -7 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 14 (T)	0,317
d -14 (T) im Vergleich zu d 45 (T)	1,0
d -14 (T) im Vergleich zu d 0 (K)	1,0
d 14 (T) im Vergleich zu d 14 (K)	0,8004
d 45 (T) im Vergleich zu d 45 (K)	0,743

d: Tag; T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4.2. Effektivität

4.2.1. Übersicht der Therapiegruppe

In der Therapiegruppe wurde innerhalb des Untersuchungszeitraumes von einem Jahr bei 9 Katzen ein Rezidiv festgestellt. Drei Katzen mussten in der Statistik zensiert werden, da sie an den Folgen einer nicht mit dem Tumor in Verbindung stehenden Erkrankung verstarben. Das entspricht einer Rezidivrate von 45%. Da im Beobachtungszeitraum nur 9 Katzen ein Rezidiv bekamen, konnte die mediane rezidivfreie Zeit nicht ermittelt werden. Die mittlere rezidivfreie Zeit liegt bei 257 Tagen.

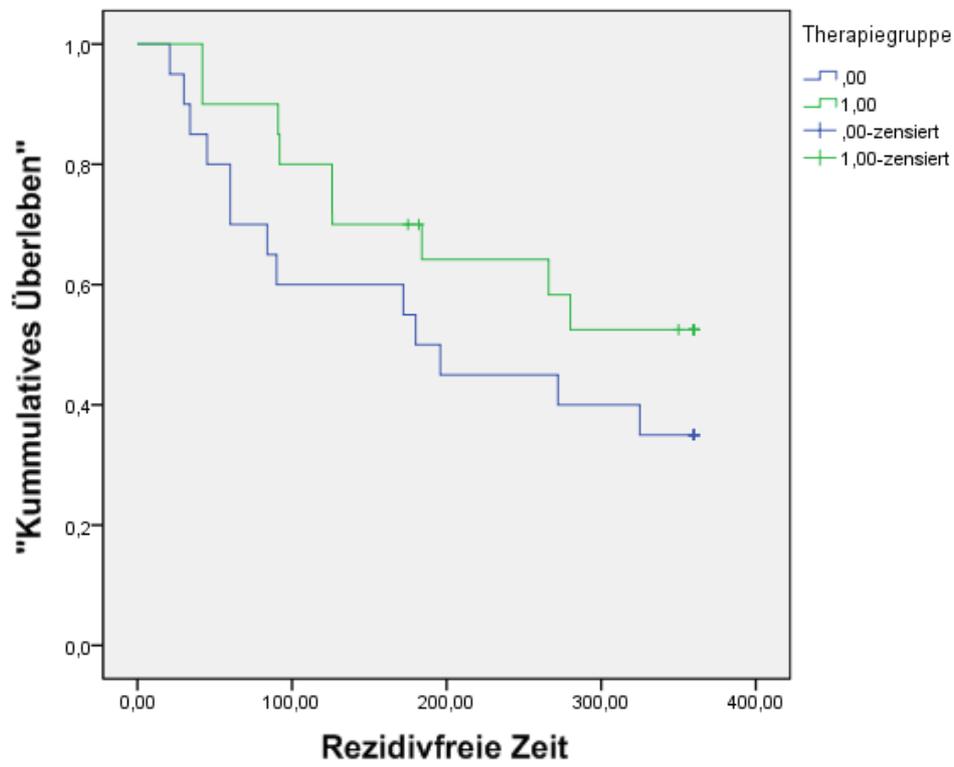
4.2.2. Übersicht der Kontrollgruppe

Die Rezidivrate der Kontrollgruppe liegt bei 65%. Es konnte bei 13 der Kontrolltiere bis zum Tag 360 ein Lokalrezidiv nachgewiesen werden. Dabei liegt die mediane rezidivfreie Zeit bei 180 Tagen, mittlere rezidivfreie Zeit bei 204 Tagen.

4.2.3. „Überlebenszeitanalyse“ der rezidivfreien Zeit

Abbildung 41 zeigt die Kaplan-Meier-Funktionen für die Therapiegruppe in grün und die der Kontrollgruppe in blau. Der Log-Rang-Test zur Überlebenszeitanalyse der rezidivfreien Zeit erbrachte einen p-Wert von 0,200.

Abbildung 12: Kaplan-Meier-Funktionen der rezidivfreien Zeit für die Therapiegruppe (grün) und die Kontrollgruppe (blau).



Die nachfolgende Tabelle liefert eine Übersicht in Bezug auf die Rezidivraten, die mediane und die mittlere rezidivfreie Zeit beider Gruppen.

Tabelle 41: Mediane rezidivfreie Zeit, mittlere rezidivfreie Zeit und Rezidivraten der Therapie- und der Kontrollgruppe

	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
Mediane rezidivfreie Zeit	-	180 Tage
Mittlere rezidivfreie Zeit	257 Tage	204 Tage
Rezidivrate bis Tag 360	45%	65%

V. DISKUSSION

1. Das Fibrosarkom als Tumormodell

Dem feline Fibrosarkom wird aus verschiedenen Gründen als Tumormodell besondere Aufmerksamkeit geschenkt und es ist mittlerweile steter Bestandteil in onkologischen Forschungsprojekten. Vor allem durch sein lokal aggressives Verhalten, den hohen Rezidivraten sowie der fehlenden überzeugenden Therapiemöglichkeiten gerät das Fibrosarkom immer wieder in den Brennpunkt. Zudem werden sowohl Tierärzte als auch Tierbesitzer mit dem vermeintlichen Zusammenhang zwischen Impfungen und Injektionen und der Fibrosarkomgenese konfrontiert, was diesen Tumor zu einem Interessenkonflikt in der Tiermedizin macht, da Tierbesitzer im Falle von iatrogen verursachten Krankheiten sehr sensibilisiert sind. Trotz intensiver Forschungsarbeit bei der Erprobung adjuvanter Therapiemöglichkeiten konnten bisher nur kleine Erfolge erzielt werden, sodass auch weiterhin nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten in der Therapie des Fibrosarkoms gesucht wird.

Nicht nur wegen Ähnlichkeiten im biologischen Verhalten, der Invasivität, dem Rezidivierungs- und Metastasierungsverhalten humaner Soft Tissue Sarkomas (VAIL und MACEWEN, 2000), sondern auch wegen der Vergleichbarkeit hinsichtlich der Größe und Zellkinetik beim Einsatz adjuvanter Therapiemöglichkeiten wie Radio- oder Chemotherapie gilt das Fibrosarkom als geeignetes Vergleichsobjekt. Darüber hinaus wird sowohl bei diversen Tumorerkrankungen in der Humanmedizin als auch beim Fibrosarkom der Katze eine chronische Entzündung als ätiologische Komponente für die Tumorgenese in Betracht gezogen. So kann zum Beispiel die Entstehung von Bronchialkarzinomen bei einer chronischen Raucherbronchitis, das Auftreten von Kolorektalkarzinomen bei dem Krankheitsbild des Morbus Crohn sowie die Entwicklung eines Speiseröhrentumors bei einer chronischen Refluxösophagitis in Verbindung gebracht werden (HORZINEK, 2001).

2. Nonviraler Gentransfer

In der vorliegenden Studie wurde auf den Einsatz von nonviralen Vektoren zurückgegriffen, da sie im Vergleich zu viralen Vektoren, die immer potentielle Pathogene darstellen, mehr Vorteile hinsichtlich der Handhabung und der Sicherheit bieten. Das Risiko des Virus durch Mutation oder Rekombination die Replikationsfähigkeit zurück zu erlangen, zwingt den Gesetzgeber, strenge Auflagen im Umgang mit viralen Vektoren zu erheben. Somit verhindern zum einen die hohen Sicherheitsanforderungen und die damit verbundenen Kosten für Produktion und Anwendung den routinemäßigen Einsatz in der tierärztlichen Praxis (NIIDOME und HUANG, 2002). Zum anderen kann es durch die mögliche Bildung von neutralisierenden Antikörpern bei wiederholter Applikation zu Therapieeffekteinbußen kommen (MÜLLER-HEIDELBERG, 2003). Auch das vermehrte Auftreten von Nebenwirkungen im Therapieverlauf stellt einen weiteren Hinderungsgrund dar, weshalb in dieser Studie ein nonviraler Vektor für den Gentransfer gewählt wurde. So konnte in der Studie von WIELAND beim Einsatz eines adenoviralen Gentransfers bei über der Hälfte der behandelten Katzen einer Körpertemperaturerhöhung festgestellt werden, bei einigen weiteren Katzen konnte zudem eine Erhöhung der Aspartataminotransferase-Aktivität im Serum nachgewiesen werden (WIELAND, 2002). Der Einsatz nonviraler Vektoren stellt sich somit als die sicherere, kostengünstigere und mit weniger Nebenwirkungen verbundene Methode des Gentransfers dar.

3. Speziesspezifische Zytokine

In der vorliegenden Studie kodieren die Plasmide für spezieseigene Zytokine. Die drei Zytokine weisen eine unterschiedliche Speziesspezifität auf. Für das feIL-2 ist die Speziesspezifität nicht hochgradig ausgeprägt. Vergleicht man die Aminosäuresequenz mit der des hu IL-2 ergibt sich eine Homologie von 81%. An zweiter Stelle reiht sich das feGM-CSF an, bei dem die Aminosäuresequenz mit dem des huGM-CSF nur mit 69% übereinstimmen. Schlusslicht bildet das feIFN- γ , das eine 63-prozentige Homologie zum huIFN- γ aufweist. Bei Anwendung humaner Zytokine bei einer Fremdspezies muss mit

Wirkungseinbußen gerechnet werden, denn je höher die Speziespezifität ausgeprägt ist, desto niedriger ist die Wahrscheinlichkeit der Erkennung des zugehörigen Rezeptors und somit auch die Wirkungsintensität. So konnte 1995 in der Studie von COZZI und Mitarbeitern eine Stimulation feline Lymphozyten durch huIL-2 nachgewiesen werden, was die Existenz einer Kreuzreaktivität bestätigt (COZZI et al., 1995). Im Allgemeinen wird beschrieben, dass bei Zytokinen erst ab einer Homologie von mindestens 60% eine Kreuzreaktivität zu erwarten ist. Ein weiterer wichtiger Grund für die vermeintlich geringere Wirksamkeit liegt der Tatsache zugrunde, dass ein speziesfremdes Zytokin vom Immunsystem als Fremdprotein erkannt und daraufhin mit einer Antikörperbildung beantwortet wird. Dadurch kann es nicht nur zu einer verminderten Zytokin-Rezeptor-Interaktion, sondern bei wiederholter Anwendung auch zu möglichen gesundheitsbeeinträchtigenden Immunreaktionen kommen, ausgelöst durch zirkulierende Antikörper.

4. Der gleichzeitige Einsatz der drei feline Zytokine

Im Rahmen der Immuntherapie in der Onkologie werden zahlreiche Zytokine sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Studien erfolgversprechend eingesetzt. Hierbei werden unter anderem auch die Kombination von IL-2 und IFN- γ sowie GM-CSF und IFN- γ im Mausmodell an unterschiedlichen Tumormodellen erprobt (KIRCHEIS et al., 1998, ROSENTHAL et al., 1994). Nach dem heutigen Wissensstand ergänzen sich die drei gewählten Zytokine optimal in ihren immunstimulatorischen Effekten. IL-2 wirkt primär auf das spezifische, GM-CSF auf das unspezifische Immunsystem, während IFN- γ sowohl das spezifische als auch das unspezifische Immunsystem aktiviert. Durch die Kombination verschiedener Zytokine soll durch die hierbei auftretenden additiven und synergistischen Effekte die Interaktion zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem optimiert und somit eine bessere antitumorale Wirkung erreicht werden. Die Studien belegen bei der Zytokinkombination potenzierte Effekte in der Immunstimulation, so dass beim Einsatz von einer verbesserten Effektivität ausgegangen werden kann. Ziel ist es, durch die Zytokinwirkung zum einen Tumorzellen zu demaskieren, indem einem der

wichtigsten *tumor-escape*-Mechanismen entgegengewirkt wird und sie somit dem Immunsystem zugänglich zu machen. Zum anderen werden auch vermehrt Effektorzellen des Immunsystems in den Tumor und dessen Umgebung gelockt. Durch die Aktivierung von B- und T-Zellen, die sich zu Gedächtniszellen des Immunsystems entwickeln können, soll es im Idealfall zur Wiedererkennung von Tumorzellen und damit zur Verhinderung von Metastasen und Lokalrezidiven kommen.

5. Festlegung der Dosis

Die Dosis von 450 µg pro Plasmid, wie sie in der Phase-I-Studie von JAHNKE angewendet wurde, wurde auf 750 µg feGM-CSF, 450 µg feIFN-γ und 150 µg feIl-2 modifiziert. Der Hintergrund dieser Intervention liegt zum einen an der überraschend hohen Frührezidivrate, der mit der Höchstdosis von 450 µg pro Plasmid therapierten Tiere, zum anderen an verschiedenen Studienergebnissen, die belegen, dass nicht zwingend von einer verbesserten Effektivität bei Dosissteigerung auszugehen ist. So ist zum Beispiel von rehuGM-CSF bekannt, dass bei Überschreitung eines systemischen Schwellenwerts eher mit immunsupprimierenden statt mit immunstimulierenden Effekten gerechnet werden muss (ARAI et al., 2000, SERAFINI et al., 2004). Für Il-2 ist eine Dosis-Wirkungs-Kurve beschrieben, die einer Gaußschen Glockenkurve gleicht (SCHMIDT et al., 1995, KIRCHEIS et al., 1998, KAPLAN et al., 1992). Bei Überschreitung einer gewissen Dosis nimmt demnach der gewünschte Effekt wieder ab, so dass die Dosierung hier maßgeblich für den Therapieerfolg zu betrachten ist. Die Hintergründe dieses sogenannten „overshoot phenomenon“ sind bis heute nicht vollständig geklärt. Ein Erklärungsansatz besagt, dass ein Überschuss an Il-2 das T-Zell-Priming sowie die Einwanderung der Antigen-präsentierenden Zellen in die Lymphknoten negativ beeinflusst (SCHMIDT et al., 1995). Eine andere Hypothese geht davon aus, dass durch zu hohe Dosen an Il-2 die Apoptose bei T-Lymphozyten eingeleitet wird, woraufhin die Immunantwort ausgeschaltet wird (ABBAS et al., 2000). Wie bereits zuvor erwähnt, lässt sich zudem in der Patientengruppe der Phase-I-Studie, in der die höchste Dosis appliziert wurde, eine Tendenz zu Frührezidiven erkennen. Obwohl die kleine

Gruppengröße der Vorläuferstudie nur eine geringe Aussagekraft hat, wurde aus den aufgeführten Gründen heraus entschieden, die Dosis zu modifizieren.

6. Magnetofektion

Die mangelnde Effektivität und Zielgerichtetheit sind entscheidende Nachteile des nonviralen Gentransfers (NIIDOME und HUANG, 2002). Um diesem Schwachpunkt entgegenzuwirken, wurden verschiedene Methoden entwickelt, die zum einen die Transfektionsrate steigern, zum anderen die zielgerichtete Applikation der Plasmide gewährleisten sollen. Neben dem Einsatz der *gene gun* und der Elektroporation wird hier besonders dem Verfahren der Magnetofektion ein großer Stellenwert zugesprochen (SOMIARI, 2000, EL-ANEED, 2004). Wie *in-vivo*- sowie *in-vitro*-Studien belegen, kann gegenüber einfachen Plasmidinjektionen durch den Einsatz der Magnetofektion die Transkriptionsrate um ein Vielfaches gesteigert werden (SCHERER et al., 2002). Nicht nur wegen der unkomplizierten Anwendbarkeit, auch aufgrund der guten Verträglichkeit der injizierten Magnetofektine bietet die Magnetofektion entscheidende Vorteile für den praktischen Einsatz. So konnten weder in der Studie von JAHNKE und Mitarbeitern noch in der Studie von HÜTTINGER und Mitarbeitern Nebenwirkungen beobachtet werden, die in Zusammenhang mit der Magnetofektion stehen. Ähnlich gute Verträglichkeit bestätigen Studien an Labortieren (SCHERER et al., 2002, ALEXIOU et al., 2007, PETRI-FINK und HOFMANN, 2007, JAIN et al., 2008). Lediglich in einer Studie von WALSCH und Mitarbeitern, in der Eisenoxidpartikel an für feGM-CSF kodierende Plasmide intratumoral bei Katzen appliziert wurde, konnte bei einer von 34 behandelten Katzen eine anaphylaktoide Reaktion in Form von Maulatmung und Salivation festgestellt werden. Zwar war hier kein medizinisches Einschreiten von Nöten, doch verdeutlicht dieser Zwischenfall klar die Wichtigkeit medizinischer Überwachung. Der große Vorzug der Magnetofektion und damit auch die Perspektive zur Anwendung unter Praxisbedingungen besteht im Vergleich zu den anderen erwähnten Verfahren eindeutig in der einfachen Durchführbarkeit. Außer einem starken Magneten sind keine weiteren Apparaturen erforderlich. Darüber hinaus ist weder eine Sedation noch eine Narkose des Patienten notwendig.

7. Nachweis der Genexpression

In der Vorgängerstudie von JAHNKE wurden mit Hilfe eines Enzym-linked-immunosorbent Assay (ELISA) Test-Kits die Zytokinkonzentrationen für feIFN- γ und feGM-CSF im Plasma der Katzen zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Erstaunlicherweise unterlag die Konzentration dieser Zytokine bereits am Tag der Erstvorstellung, also vor der ersten neoadjuvanten Behandlung einer erheblichen Spannweite, so dass es nur schwer möglich ist, sich auf eine katzen-physiologische Zytokinkonzentration im Plasma festzulegen. Fünf Katzen, deren Zytokinkonzentration sich bei Erstvorstellung für feIFN- γ und feGM-CSF unterhalb der Nachweisgrenze befand, entwickelten nach der intratumoralen Gentherapie messbare Zytokinkonzentrationen im Plasma. Da drei dieser Katzen die höchste Dosisstufe von 450 μg pro Plasmid erhielten, kann durchaus von einem therapiebedingten Anstieg der systemischen Zytokinkonzentration ausgegangen werden. Da eine erfolgreiche Immunstimulation jedoch keine Erhöhung der systemischen Zytokinkonzentration erfordert und auch eine lokal beschränkte Expression der Zytokingene ausreicht, das Immunsystem zu stimulieren, wurde in dieser Studie auf den Zytokinnachweis im Plasma verzichtet. Auch von dem Nachweis der zu erwartenden erhöhten Zytokinkonzentration in den Tumorproben wurde abgesehen. Der Grund hierfür liegt zum einen an der geringen Sensivität der ELISA-Test-Kits für GM-CSF und IFN- γ , die die Detektion der Zytokine 14 und 7 Tage nach der letzten Injektion nahezu unmöglich macht. Ein Tumorbiopat zwei bis drei Tage nach der Injektion könnte zwar den Nachweis der Transfektion erbringen, ist für diese Phase-II-Studie, die ihren Schwerpunkt auf die Ermittlung der Nebenwirkungen im Therapieverlauf legt, jedoch ungeeignet, da die Stressoren, die bei einer solchen Biopatentnahme auf die Katzen wirken, die Ergebnisse der Auswertung der Nebenwirkungen mitunter stark verfälschen könnten. Zum anderen kommt erschwerend hinzu, dass die durch die Gentherapie exprimierten Zytokine nicht von den physiologisch gebildeten zu unterscheiden sind, da die Gensequenzen nicht an ein Markerprotein gekoppelt sind. Mit der Etablierung eines sicheren Markerproteins oder der Ermittlung extrem großer Zytokinkonzentrationen in den

Tumorproben könnte somit ein Transfektionsnachweis erbracht werden.

8. Nebenwirkungen

Die einzigen vermutlich mit der Therapie in Zusammenhang stehenden Nebenwirkungen der vorausgegangenen Phase-I-Studie von JAHNKE und Mitarbeitern waren Anorexie und Vomitus. Diese begannen bei einer Katze nach Applikation der höchsten Dosisstufe, dauerten drei Tage lang an und wurden als wahrscheinlich mit der Therapie in Zusammenhang stehend (Korrelationsgrad VI) beurteilt (JAHNKE et al., 2008). Da eine Tendenz zu Ausbildung von Frührezidiven, bei Anwendung der höchsten Dosisstufe von 450 µg pro Plasmid bereits in der Phase-I-Studie zu bemerken war, wurde für die hier vorliegende Phase-II-Studie die Dosis modifiziert. So zeigten auch in dieser Studie sechs der Therapiekatzen an Tag -7 ein lethargisches Verhalten mit dem Schweregrad 1, eine weitere Katze wies zudem eine Anorexie des Schweregrades 1 auf. An dem Tag 0 wiesen jeweils drei Katzen Lethargie, sowie drei weitere Anorexie auf. Milde Anzeichen von Vomitus wurden bei drei Katzen an Tag 14 und bei einer Katze an Tag 45 beschrieben. Obwohl bei keiner der Katzen der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt das Auftreten von Erbrechen festgestellt werden konnte, wird aufgrund des großen zeitlichen Abstands zu den Injektionen sowie der hohen Wahrscheinlichkeit eines postoperativen oder medikamentösen Zusammenhangs dieser Parameter nicht mit der Therapie in Verbindung gebracht. Der Parameter Lethargie zeigt am Tag -7 beim Vergleich zum Aufnahmetag eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,014, was einen Zusammenhang mit der Therapie nahelegt. Eine weitere statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,046 ist beim Vergleich des Parameters Anorexie der Tage -14 und 14 zu verzeichnen. Und da im Vergleich zu den vier anorektischen Katzen der Therapiegruppen nur eine Katze der Kontrollgruppe an Tag 14 ein mildes anorektisches Verhalten aufwies, kann von einem möglichen therapiebedingten Zusammenhang ausgegangen werden. Nicht nur in veterinärmedizinischen Studien, die sich mit der Injektion der Zytokine Il-2, GM-CSF und IFN-γ beschäftigten (JAHNKE et al., 2007, KEMPF, 2005), sondern auch in humanmedizinischen Studien berichten bei der Anwendung einer oder mehrerer dieser Zytokine bereits von Nebenwirkungen in Form von Anorexie, Vomitus und

Lethargie (CAPURON et al., 2002, RYAN et al., 2000, NADAL et al., 2004). Der mit einem p-Wert von 0,023 als statistisch signifikant auffallende Gewichtsverlust der Therapiegruppe an Tag 14 kann einerseits auf die zuvor beschriebenen Nebenwirkungen wie Anorexie und Vomitus zurückgeführt werden. Andererseits spielt auch der Massenverlust bei Tumorexstirpation eine nicht zu unterschätzende Rolle. Beim Vergleich der beiden Gruppen miteinander konnte jedoch keine statistische Signifikanz ermittelt werden, so dass der Gewichtsverlust als wahrscheinlich nicht mit der Therapie in Zusammenhang stehend beurteilt werden muss. An Tag -14 zeigten vier Katzen der Therapiegruppe eine Körpertemperaturerhöhung vom Grad 1 auf. Verglichen mit der physiologischen Körpertemperatur an Tag -7 ergibt sich rechnerisch eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,046. Am ehesten lässt sich diese Auffälligkeit den erhöhten Stressfaktoren, denen die Katzen bei Erstvorstellung ausgesetzt waren, zuschreiben. Beim statistischen Vergleich mit der Kontrollgruppe konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden, so dass die Körpertemperaturerhöhung nicht mit der Therapie in Assoziation gebracht werden kann.

Zwei Katzen zeigten kurz nach der zweiten intratumoralen Applikation der Gentherapie eine milde, vermutlich mit der Therapie in Zusammenhang stehende Reaktion, die jedoch ohne medizinische Interventionen in den Griff zu bekommen waren. Bei Katze Nr. 5 äußerte sich diese mit Hypersalivation. Bei Katze Nr. 16 konnte ein gurgelndes Atemgeräusch, Tachypnoe sowie ein kurzfristiger horizontaler Nystagmus beobachtet werden. Da die Reaktionen jeweils erst kurz nach der zweiten Applikation der Gentherapie auftraten, kommen als Ursache in beiden Fällen eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I in Betracht. Solch eine Reaktion setzt einen Erstkontakt, also eine Sensibilisierung vor dem offensichtlichen Ereignis, voraus. Deshalb kommen als die auslösenden Agenzien auch alle Bestandteile der Injektionslösung in Betracht. Sowohl die Plasmide selber als auch die mit PEI beschichteten Nanopartikel aus Eisenoxid stellen potentielle Antigene dar, die somit derartige Reaktionen auslösen könnten. Da der Verlauf der beschriebenen Nebenwirkungen selbstlimitierend und eher von milder Natur zu beurteilen ist, kann daneben sowohl erhöhter Stress infolge der Behandlung als auch mit der Injektion verbundene Schmerzen als Ursache in Erwägung gezogen werden. Ob es sich tatsächlich um akut-allergische Reaktionen handelt, könnte jedoch nur über einen Hauttest oder über den Nachweis von

allergenspezifischen Antikörpern in Erfahrung gebracht werden.

Betrachtet man das rote Blutbild, so lässt sich bezüglich des Hämatokritabfalls an Tag 14, verglichen mit Tag -14, eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,034 ermitteln. Obwohl beim Vergleich mit der Kontrollgruppe rechnerisch keine Signifikanz vorliegt, muss neben dem operationsbedingten Blutverlust und dem damit verbundenen Abfall der Hämatokritkonzentration auch die allgemein bekannte Nebenwirkung einer hämolytischen Anämie nach Zytokinapplikation in Erwägung gezogen werden. Da bei keinem der Tiere eine medizinische Intervention zur Regulation des Hämatokrits in den Referenzbereich von Nöten war und in den Blutaussstrichen auch keine Sphärozyten zu finden waren, wird auch nicht von einer therapiebedingten Nebenwirkung in Form einer hämolytischen Anämie ausgegangen. Der Abfall des Hämatokrits wird demnach einem erhöhten Blutverlust *intra operationem* zugeschoben. Bei Betrachtung des weißen Blutbilds kann wie auch in der vorausgegangenen Phase-I-Studie von JAHNKE und Mitarbeitern kein statistisch signifikanter Unterschied des Abfalls der Leukozytenkonzentration im Therapieverlauf registriert werden (JAHNKE et al., 2007). In der Studie von KEMPF wiesen die Katzen, die die höchste Dosisstufe der mit Plasmid getränkten Schwämmchen erhielt, einen signifikanten Unterschied in diesem Blutparameter auf. Diese Lymphopenie wurde mit der Wirkung des in dieser Studie verwendeten Il-2-Plasmids begründet, welches als exprimiertes Il-2 die Tumornekrosefaktor-alpha-Sekretion und somit vor allem einen Abfall von B-Lymphozyten induziert (KEMPF, 2005). In dieser Studie wurde jedoch nur 150µg feIl-2 eingesetzt, was verglichen mit der Studie von KEMPF, in der 600µg pro Plasmid in der höchsten Dosisstufe eingesetzt wurde, nur ein Bruchteil der Plasmidmenge darstellt. Auch das restliche weiße Blutbild zeigte keinerlei Auffälligkeiten, die der Therapie zugerechnet werden müssten. Bei Betrachtung der Serumwerte fällt auf, dass bereits fünf Katzen der Therapiegruppe bei Erstvorstellung eine Erhöhung der Kreatininkonzentration aufwiesen, die dem Schweregrad 1 zuzuordnen sind. Rechnerisch ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,046 beim Vergleich mit dem Tag 45 *post operationem*, an dem keine der Katzen eine Erhöhung in der Kreatininkonzentration mehr aufwiesen. Die intravenöse Flüssigkeitssubstitution während des stationären Aufenthalts liefert den wahrscheinlichsten Erklärungsversuch für die Verbesserung der Nierenwerte. Viele Tiere der

Therapiegruppe genauso wie auch die der Kontrollgruppe zeigten während der Kontrolltermine Hyperglykämien von meist geringem Ausmaß. Ein Diabetes mellitus wurde bei allen Katzen, die eine Erhöhung in der Blutglukosekonzentration aufwiesen, durch die Ermittlung der Blutfruktosaminkonzentration ausgeschlossen. Da sowohl bei den Therapiekatzen als auch bei den Kontrollkatzen Hyperglykämien festzustellen waren, und die Injektionen grundsätzlich erst nach der Blutuntersuchung stattfand, werden diese Veränderungen als nicht mit der Therapie in Zusammenhang stehend bewertet. Eine stressbedingte Erhöhung der Blutglukosekonzentration liefert die wahrscheinlichste Erklärung.

9. Effektivität

Das Hauptaugenmerk dieser Phase-II-Studie lag in der Erfassung möglicher therapiebedingter Nebenwirkungen. Daneben sollten jedoch auch die Rezidivraten beider Gruppen betrachtet werden, um eine Tendenz in der Effektivität abschätzen zu können. Von den 20 mit der adjuvanten Gentherapie therapierten Katzen erfuhr 9 Tiere innerhalb des Untersuchungszeitraums von einem Jahr ein Lokalrezidiv. Das entspricht einer Rezidivrate von 45%. Die mediane rezidivfreie Zeit konnte nicht ermittelt werden, da im Beobachtungszeitraum nur 9 der 20 Katzen ein Lokalrezidiv bekamen. Die mittlere rezidivfreie Zeit betrug 257 Tage. Verglichen mit der Gruppe der Kontrolltiere, in der bei 13 Tieren ein Lokalrezidiv festgestellt werden konnte, die Rezidivrate bei 65% und die mittlere rezidivfreie Zeit bei 204 Tagen lag, kann man durchaus eine Tendenz der Wirksamkeit der Gentherapie erkennen. Die mediane rezidivfreie Zeit der Kontrollgruppe liegt bei 180 Tagen. Der Log-Rank-Test liefert beim Gruppenvergleich der Überlebenszeitanalyse einen p-Wert von 0,200 und verfehlt somit eine statistische Signifikanz. Als Grund für den statistisch nicht signifikanten Log-Rank-Test trotz deutlicher Abweichung der Rezidivraten sind die geringen Gruppengrößen zu sehen. Um eine endgültige Aussage über einen Therapieerfolg treffen zu können und eine statistische Signifikanz zu bestätigen, wäre bei gleichen Rezidivraten eine Größe von 96 Tieren je Gruppe zu untersuchen. Die bislang besten Ergebnisse mit Rezidivraten von 28-39% erbrachten JOUDIER und Mitarbeiter,

die den Katzen eine Multimodalitätstherapie zukommen ließen, die neben der chirurgischen Tumorexstirpation, eine Brachyradiotherapie sowie eine Gentherapie mit katzeneigenen Zytokingenen enthielt (JOUДИER et al., 2003).

10. Schlussbetrachtung

Die neoadjuvante Gentherapie mit nonviralen Vektoren hat sich als sichere und gut durchführbare Methode zur Behandlung des feline Fibrosarkoms erwiesen. Nicht nur wegen der hohen Akzeptanz von Seiten der Patientenbesitzer aufgrund der möglichen ambulanten Durchführbarkeit, sondern auch wegen der guten Toleranz auf Seiten der Katzen, ist sie für den Einsatz in der tierärztlichen Praxis als vielversprechendes Modell zu bewerten.

Trotz einer ausführlichen und guten Studienplanung gibt es auch in dieser Studie einige Schwachstellen, die im Folgenden angesprochen werden sollen:

Aus ethischen Gesichtspunkten wurden die Katzen der Kontrollgruppe bereits einen Tag nach der Aufnahmeuntersuchung operiert und konnten somit den Tieren der Therapiegruppe nicht parallel geschaltet werden. Weder die Injektion leerer Plasmide noch eine Wartezeit von zwei Wochen ohne therapeutische Maßnahmen konnte zu Gunsten der Tiergesundheit als vertretbar angesehen werden.

Eine objektive Vergleichbarkeit ist durch die Gegenüberstellung mit einer historischen Kontrollgruppe nur eingeschränkt möglich, obwohl die Katzen nach den Parametern Tumorgröße und Tumorstatus, also essentiellen prognostischen Faktoren, aus dem Pool der Kontrollkatzen zum Vergleich für diese Therapiegruppe ausgewählt wurden.

Eine weitere Schwachstelle der Studie ist die Gruppengröße. Sowohl in der Therapie- als auch in der Kontrollgruppe ist die Anzahl der Katzen zu klein, um eine definitive Aussage bezüglich der Effektivität machen zu können.

Das Primärziel der Studie, anhand eines größeren Patientenkollektivs als in der Phase-I-Studie, mögliche Nebenwirkungen und eventuell auftretende Toxizitäten, die in Zusammenhang mit der Therapie stehen könnten, festzustellen, wurde

erreicht. So konnte die in der vorausgegangenen Phase-I-Studie ermittelte Unbedenklichkeit der Therapie bestätigt werden. Die aufgetretenen Nebenwirkungen waren überwiegend von schwachem Ausmaß und konnten meist nicht mit der Therapie in Zusammenhang gebracht werden. Auf der anderen Seite konnte zwar keine statistische Signifikanz hinsichtlich der Effektivität ermittelt werden, aufgrund der Rezidivraten lässt sich jedoch durchaus eine Richtung erkennen, die eine Wirksamkeit dieser Therapie nahe legt. In einer prospektiven, randomisierten und kontrollierten Phase-III-Studie könnte eine Prüfung der vorläufigen Ergebnisse anhand eines größeren Patientenkollektivs durchgeführt werden, um eine endgültige Aussage bezüglich der Effektivität zu treffen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Fibrosarkom der Katze zählt zu den bösartigsten und häufigsten Tumorerkrankungen in der tierärztlichen Praxis. Bei alleiniger Tumorexstirpation liegt die Rezidivrate bei bis zu 70%, weshalb die Heilungsaussicht und damit die Prognose als schlecht zu bewerten ist. Zwar kann die Rezidivrate mit adjuvanten Therapieverfahren wie der Radiotherapie auf bis zu 41% gesenkt werden, diese findet aber aufgrund des enormen finanziellen und logistischen Aufwandes nur selten Anwendung. In dieser klinischen Phase-II-Studie wurde mittels einer neoadjuvanten immunstimulierenden Gentherapie, in der die drei feline Zytokin-Gene IL-2, IFN- γ und GM-CSF verwendet wurden, einem weiteren Ansatzpunkt in der Tumorthherapie nachgegangen. Da in der Studie nonvirale Vektoren in Form von Plasmiden zum Einsatz kamen, wurde die Methode der Magnetofektion eingesetzt, um so die Transfektionsrate zu steigern.

In der vorliegenden Arbeit sollten zum einen anhand eines größeren Patientenkollektivs mögliche Nebenwirkungen und Toxizitäten erfasst und in Korrelation mit der Therapie gestellt werden. Als zweites Ziel galt es, eine vorläufige Aussage über die Wirksamkeit und den Behandlungserfolg zu treffen, um somit die Effektivität der Therapie besser abschätzen zu können.

Das Behandlungsprotokoll der Therapiegruppe umfasste zwei präoperative intratumorale Injektionen der Gentherapie jeweils 7 und 14 Tage vor der Tumorexstirpation. Eine gleichgroße Kontrollgruppe, die nachträglich aufgrund prognostischer Faktoren aus einem klinkeigenen Patientenkollektiv ausgewählt wurde, erhielt eine Tumorexstirpation ohne die neoadjuvante Gentherapie. Aus ethischen Gründen wurde bei diesen Tieren auf eine Vorlaufzeit von zwei Wochen sowie auf die Gabe eines Placebopräparates verzichtet.

Bei der statistischen Auswertung der Nebenwirkungen wurden sowohl Vergleiche innerhalb der Therapiegruppe als auch Vergleiche zwischen Therapie- und Kontrollgruppe angestellt. Die Untersuchungen erfolgten am Tag der zweiten Injektion, am Tag vor der Operation sowie 14 und 45 Tage nach der Operation. Klinische Auffälligkeiten und Veränderungen, die bei den Blutuntersuchungen festzustellen waren, wurden mit Hilfe der VCOG-CTCAE-Tabelle ausgewertet und in Korrelation mit der Therapie gesetzt. Die im Untersuchungszeitraum

auffallenden Nebenwirkungen waren meist von milder Natur und in den meisten Fällen nicht mit der Therapie in Verbindung zu bringen. Somit kann die bereits angenommene Unbedenklichkeit der adjuvanten Gentherapie bestätigt werden.

Eine Untersuchung auf das Auftreten von Tumorrezidiven erfolgte jeweils an den Tagen 14, 45, 90, 180, 270 und 360 nach der Operation. Zur statistischen Auswertung der Effektivität wurde eine Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche durchgeführt und mit einem Log-Rank-Test ausgewertet. 65% der Kontrolltiere und 45% der therapierten Tiere bekamen innerhalb eines Jahres ein Lokalrezidiv. Der p-Wert von 0,200 des Log-Rank-Tests zeigt zwar, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der 1-Jahres-Rezidivrate zwischen der Therapie- und der „historischen“ Kontrollgruppe bestehen, die beobachteten Ergebnisse hinsichtlich der Rezidivraten sind in Bezug auf den Therapieerfolg jedoch durchaus als erfolgsversprechend zu bewerten, denn der Effekt einer immunologischen Gentherapie ist erst nach Monaten zu erwarten. Viele Patienten hatten allerdings schon ein Rezidiv innerhalb der ersten 6 Monate. Infolgedessen war die Gruppengröße nach einem halben Jahr nur noch gering, und eine statistische Signifikanz der deutlichen Unterschiede nicht vorhanden.

VII. SUMMARY

Feline fibrosarcoma is one of the most malignant and common tumors in the veterinary clinical praxis. After the removal of the tumor up to 70% of the cats develop local recurrences, wherefore the prospect of a permanent cure and thus the prognosis is evaluated as poor. Adjuvant therapy methods such as radiotherapy can noticeably reduce the recurrence rate up to 41%; however, such methods are unpopular due to the tremendous financial and logistical investment. In the current phase II clinical trial an additional starting point for tumor therapy was pursued using a neoadjuvant immunostimulating gene therapy, in that the 3 feline cytokine genes IL-2, IFN- γ , and GM-CSF were used. Because nonviral vectors in the form of plasmids were used, the magnetofection method was applied in order to increase the transfection rate.

On the one hand the present work should record and correlate to the therapy any possible side effects and toxicities using the large group of patients. On the other hand, it was necessary to make a preliminary prediction regarding the efficiency and success of treatment in order to therefore more accurately assess the effectiveness of the therapy.

The treatment protocol of the therapy group contained two preoperative intratumoral injections of the gene therapy, at a time of 7 and 14 days before tumor extirpation. An equal-sized control group, which was chosen retrospectively out of a clinic-owned patient population, based on prognostic factors, received just the tumor extirpation without neoadjuvant treatment. For ethical reasons, a lead time of 2 weeks as well the administration of a placebo were not planned for these animals.

For statistical analysis of the side effects, comparisons within the therapy group as well as comparisons between the therapy and control groups are conducted. The clinical examination and tests were performed at the day of the second injection, on the day before the operation as well as 14 and 45 days after the operation. Clinical abnormalities and changes determinable from the blood tests were evaluated with the aid of VCOG-CTCAE tables and correlated to the therapy. The side effects occurring within the investigation period were mild and in most cases

not associated with the therapy. Therefore, the harmlessness of the therapy already assumed can be confirmed.

An investigation of the occurrence of tumor recurrences occurred on days 14, 45, 90, 180, 270, and 360 post operationem. For the statistical analysis of effectiveness, a survival period analysis for group comparisons was conducted and evaluated using a log-rank-test. 65% of the control animals and 45% of the animals that received therapy experienced a local recurrence within one year. The p-value of 0.200 from the log-rank-test demonstrates the non-existence of statistical significance relating to the one-year relapse rate between therapy and control group. However, the observed findings regarding the relapse rates are evaluated as promising in relation to the therapy results because the effects of immunological gene therapy will first be observed after 6 month. Consequently, the size of the group was still small after half a year and exhibited no significant statistical difference.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abbas AK, Lichtmann AH, Pober JS:

Tumorimmunität. Immunologie.

Verlag Hans Huber; Bern; 1996;428-51

Abbas AK, Lichtmann AH, Pober JS:

Cellular and Molekular Immunology.

4ed . Philadelphia; 2000; 243-74

Al Sarraf R:

Update on vaccine-associated fibrosarcomas.

Vet Med 1998; 729-35

Arai M, Darman J, Lewis A, Yamamoto JK:

The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats.

Vet Immunol Immunopathol 2000; 77(1-2):71-92

Argyle DJ:

Gene therapy in veterinary medicine.

Vet Rec 1999; 144(14): 369-76

Armitage JO:

Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

Blood 1998; 92(12): 4491-508

Armstrong AC, Hawkins RE:

Vaccines in oncology: background and clinical potential.

Br J Radiol 2001;74(887):991-1002

Atkins MB, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA:

High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update.

Cancer J Sci Am. 2000; 6 Suppl 1:11-4

Aul C, Schneider W:

Interferons: Biological activities and clinical efficiency.

Springer Verlag; Berlin 1997:250-266

Baluna R, Vitetta ES:

Vaskulatory leak syndrome: a side effect of immunotherapy.

Immunopharmacology. 1997;37(2-3): 117-32

Banerji N, Li X, Klausner JS, Kapur V, Kanjilal S:

Evaluation of in vitro chemosensitivity of vaccine-associated feline sarcoma cell lines to vincristine and paclitaxel.

Am J Vet Res 2002; 61(17):6451-8

Banerji N, Kanjilal S:

Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma.

J Hered. 2007;98(5):421-7

Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR:

Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signaling.

Nature. 1998;393(6684):478-80

Blattman JN, Greenberg PD:

Cancer immunotherapy: a treatment for the masses.

Science 2004;305(5681):200-5

Bremers AJ, Parmani G:

Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments.

Crit Rev Oncol Hematol 2000;34(1):1-25

Brill TH, Barba M, Breul J, Gänsbacher B:

Gentherapie des Prostatakarzinoms.

Internist 2001;42:1328-45

Brown NO, Patnaik AK, Mooney S et al.:

Soft tissue sarcomas in the cat.

J Am Vet Med Assoc 1978; 173: 744-49

Buchsel PC, Forgey A, Grape FB, Hamann SS:

Granulocyte-makrophage colony-stimulating factor: current practice and novel approaches.

drCrit Rev Oncol Nurs. 2002; 6(4):198-205

Buracco P, Martano M, Morello E, Ratto A:

Vaccine-associated-like fibrosarkoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat.

Vet J, 2002Jan;163(1):105-7

Burton G, Mason KV:

Do postvaccinal sarcomas occur in Australian cats?

Aust Vet J. 1997 Feb; 75(2):102-6

Capuron L, Ravaud A, Neveu PJ, Miller AH, Maes M, Danzer R:

Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy.

Mol Psychiatry 2002; 7(5); 468-73

Catros-Quemmer V, Bouet F, Genetet N:

Immunité anti-tumorale et thérapies cellulaires du cancer.

Medicine/Science. 2003;19:43-53

Cohen M, Wright JC, Brawer 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

Coley W:

Further observations upon the treatment of malignant tumors with the toxins of erysipelas and bacillus prodigiosus with a report of 160 cases.

Bull Johns Hopkins Hospital. 1896;7:157

Costello RT, Gastaut JA, Olive D:

Tumor escape from immune surveillance.

Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 1999;47(2):83-8

Couto SS, Griffey SM, Duarte PC, Madewell BR:

Feline vaccine-associated sarcoma: morphologic distinctions.

Vet Pathol 2002;39(1):33-41

Coyne MJ, Reeves NC, Rosen DK:

Estimated prevalence of injection-site sarcomas in 33 cats.

J Am Vet Med Assoc 1997; 210(2): 249-51

Cronin K, Page RL, Spodnick G, Dodge R, Hardie EN, Prince GS,**Ruslander D, Thrall DE:**

Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats.

Vet Radiol Ultrasound 1998;39(1):51.6

Daly MK, Saba CF, Crochik SS, Howerth EW, Kosarek CE, Cornell KK,**Roberts RE, Northrup NC:**

Fibrosarkoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat.

J Feline Med Surg 2008. (Epub ahead of print)

Davidson EB, Gregory CR, Kass PH:

Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats.

Vet Surg 1997 Jul-Aug; 26(4):265-9

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(20):4073-84

De Man MM, Ducatelle RV:

Bilateral subcutaneous fibrosarcoma in a cat following feline parvo-, herpes- and calicivirus vaccination.

J Feline Med Surg. 2007 Oct;9(5):432-4

Djeraba A, Quere P:

In vivo macrophage activation in chickens with Acemannan, a complex carbohydrate extracted from Aloe vera.

International journal of immunopharmacology. 2000 May;22(5): 365-72

Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW, Janovitz EB:

Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites.

J Comp Pathol 1996 Feb;114(2):165-74

Ehrlich P:

Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung.

Ned Tijdschr Geneesk. 1909; 53: 273-90

Eisner RM, Husain A, Clark JI:

Case report and brief review: IL-2-induced myocarditis.

Cancer Invest 2004; 22: 401-404

Ellis JA, Jackson ML, Bartsch RC, Mc Gill LG, Martin KM,**Trask BR, Haines DM:**

Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed paraffin-embedded fibrosarcomas in cats.

J Am Vet Med Assoc. 1996 Aug 15;209(4):767-71

Elmslie RE, Dow SW, Ogilvie GK:

Interleukins: biological properties and therapeutic potential.

J Vet Intern Med 1991; 5: 283-93

Elmslie RE, Dow SW:

Genetic immunotherapy for cancer.

Semin Vet Med Surg (Small Anim) 1997;12:193-205

Esplin DG, Bigelow M, Mc Gill LD:

Fibrosarkoma at the site of a lufenuron injection in a cat.

Vet Cancer Soc Newsletter 1999; 23:8-9

Esplin DG, Mc Gill LD, Meininger AC, Wilson SR:

Postvaccination sarcomas in cats.

J Am Vet Med Assoc 1993 Apr 15; 202(8): 1245-7

Farrar WL, Johnson HM, Farrar JJ:

Regulation of the production of the immune interferon and cytotoxic

T lymphocytes by interleukin 2.

J Immunol 1981;126: 1120-1125

**Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitzky HI, Simons JW,
Karasuyama H, Vogelstein B, Frost P:**

*Interleukin-2 produktion by tumor cells bypasses T helper function in
the generation of an antitumor response.*

Cell.1990;60(3): 397-403

Fischer HG, Frosch S, Reske K, Reske-Kunz AB:

*Granulocyte-makrophage colony-stimulating factor activates mackrophages
derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules
and to augmented antigen presentation function.*

J Immunol. 1988;141(11): 3882-8

Foss FM:

Immunologic mechanisms of antitumor activity.

Semin Oncol. 2002;29(3 Suppl 4):5-11

Gagnon A:

Drug injection-associated fibrosarcoma in a cat.

Feline Practice.2000;28:18-21

Gaskell RM, Bennett M:

Feline Leukaemia virus infection – feline sarcoma virus.

<http://www.provet.co.uk/infectiousdiseases; 2002>

Gedek B, Kaaden O-R, Mahnel H, Mayr A:

Spezielle Virologie-Retroviridae.

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre;

Ferdinand Enke Verlag; Stuttgart; 1993; 377-84

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 May15;220(10):1477-82

Gonsalves SF, Landgraf BE, Ciardelli TL, Borison HL:

Early toxicity of recombinant interleukin-2 in cats.

Arch Int Pharmacodyn Ther 1991;310: 175-185

Grösslinger K, Alton K, Lorison D:

Histologische Bestimmung der Tumorgrenzen und Evaluierung der Rezidivrate beim felinen vakzine-induzierten Fibrosarkom.

Kleintierprax 2003;48:261-268

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;21(6):1340-6

Hampel V, Schwarz B, Kempf C, Köstlin R, Schillinger U, Küchenhoff H, Fenske N, Brill T, Hirschberger J:

Adjuvant immunotherapy of feline fibrosarcoma with recombinant feline interferon-omega.

J Vet Intern Med. 2007 Nov-Dec;21(6):1340-6

Hendrick MJ:

Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis.

J Am Vet Med Assoc 1998; 213(10): 1425-6

Hendrick MJ:

Feline vaccine-associated sarcomas.

Cancer Invest 1999; 17(4):273-7

Hendrick MJ, Brooks JJ:

Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry.

Vet Pathol. 1994 Jan;31(1):126-9

J Am Vet Med Assoc. 2002 May15;220(10):1477-82

Hendrick MJ, Goldschmidt MH :

Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats?

J Am Vet Med Assoc 1991; 199: 968

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 Nov 15;205(10):1425-8

Hendrick MJ:

Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis.

J Am Vet Med Assoc. 1998 Nov 15;213(10):1425-6

Hendricj MJ:

Feline vaccine-associated sarcomas.

Cancer Invest. 1999;17(4):273-7

Hershey AE, Dubielzig RR, Padilla ML, Helfand SC:

Abberant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas.

Cancer Invest. 1999;17(4):273-7

Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, et al.:

Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996).

J Am Vet Med Assoc 2000; 216(1):58-61

Hirschberger J, Kessler M:

Das feline Fibrosarkom.

Tierärztl Prax. 2001; 29(K): 66-71

Hoots EA:

Charaterization of genetic alterations in feline vaccine-associated sarcoma using whole chromosome painting probes.

ACVIM; 2001

Horzinek MC:

Fibrosarkome bei Katzen am Injektionsort- eine Stellungnahme.

Kleintierpraxis 2001; 46: 661-3

Huth S, Lausier J, Gersting SW, Rudolph C, Plank C, Welsch U:

Insights into the mechanism of magnetofection using

PEI-based magnetofectins for gene transfer.

J Gene Med 2004, 6(8): 923-36

Hüttinger C, Hirschberger J, Jahnke A, Köstlin R, Brill T, Plank C, Küchenhoff H, Krieger S, Schillinger U:

Neoadjuvant gene delivery of feGM-CSF using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: A phase I trial

Jahnke A, Hirschberger J, Fischer C, Brill T, Köstlin R, Plank C, Küchenhoff H, Krieger S, Kamenica K, Schillinger U:

Intra-tumoral Gene delivery of feIL-2, feIFN-gamma and feGM-CSF using Magnetofection as a neoadjuvant treatmentoption for feline fibrosarkomas: A Phase I Study

J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2007;54(10):599-606

Jorger K:

Hauttumoren bei Katzen. Vorkommen und Häufigkeit im Untersuchungsgut (Biopsien 1984-1987) des Instituts für Veterinärpathologie Zürich, Schweiz Arch Tierheilk 1988; 810-820

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 (IL-2).

Gene Ther.2003 Dec;10(26):2126-32

Kaaden O-R:

*Viruskrankheiten der Tiere. Rolle M, Mayr A, editors
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.
7.Auflage Stuttgart: Enke Verlag; 2002 p. 335*

Kalat M, Mayr B, Schleger W, Wagner B, Reifinger M:

Chromosomal hyperploidy in a feline sarcoma.

Res Vet Sci. 1991 Sep; 51(2): 227-8

Kaplan G, Cohn ZA, Schmith KA:

Rational immunotherapy with interleukin 2.

Biotechnology (NY) 1992; 10(2); 157-62

Kass PH, Barnes WG, Spangler WL, Chomel BB, Culberston MR:

Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats.

J Am Vet Med Assoc. 1993Nov 1, 223(9):396-405

Kempf C:

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. 2005

Kent ME:

Use of an immunostimulant as an aid in treatment and management in fibrosarcoma in three cats.
Feline Practice 1993;21(6):13-7

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 Sep;61(9): 1037-41

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. 2001 Dec;62(12):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. 2001 Jun; 62(6):828-32

Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, Burnham M, Teifke JP, Czerwinski G, Jackson ML:

Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas in cats for papillomavirus DNA and antigen.
Am J Vet Res. 2001 Jun;62(6):833-9

Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, Burnham M, Jackson ML:

Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas in cats for feline foamy virus DNA.
Am J Vet Res. 2002 Jan;63(1):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 Sep-Oct;31(5):439-47

Kircheis R, Kupcu Z, Wallner G, Wagner E:

Cytokine gene-modified tumor cells for prophylactic and therapeutic vaccination: IL-2, IFN-gamma, or combination IL-2 + IFN-gamma. Cytokines, Cell Mol Ther 1998 Jun;4(2): 95-103

Kirkwood JM, Wilson J, Whiteside TL, Donnelly S, Herberman RB:

Phase IB trial of picibanil(OK-432) as an immunomodulator in patients with resected high-risk melanoma. Cancer Immunol immunother. 1997;44(3): 137-49

Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, Pace RL, Prince GS, Williams LE, Hardie EM, Mathews KG, Trall DE:

Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcomas in 92 cats. Vet Radiol Ultrasound 2002;43:473-479

Krotz F, de Wit C, Sohn HY, Zahler S, Gloe T, Pohl U:

Magnetofection a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo. Mol Ther 2003; 7(5 Pt 1): 700-10

Krotz F, Sohn HY, Gloe T, Plank C, Pohl U:

Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. J Vasc Res 2003;40(5): 425-34

Kuntz CA, Powers BE:

Modified wide local excision for vaccine associated soft tissue sarcomas in cats. Vet Surg 2000;29(5):481

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(2): 91-5.

Lidbetter DA, Williams FA, Krahwinkel DJ, Adams WH:

Radical lateral body-wall resection for fibrosarcoma with reconstruction using polypropylene mesh and a caudal superficial epigastric axial pattern flap: a prospective clinical study of the technique and results in 6 cats. Vet Surg 2002;31(1):57-64

Macy DW:

The potential role and mechanisms of FeLV vaccine-induced neoplasms. Semin Vet Med Surg (Small Anim) 1995 Nov; 10(4):234-7

Macy DW, Hendrick MJ:

The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats.

Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1996Jan;26(1).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(2):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(1):84-90

Mayer MN, Treuil PL, LaRue SM:

Radiotherapy and surgery for feline soft tissue sarcoma.

Vet Radiol Ultrasound Vol 50, No.6, 2009, pp 669-672

Mayr B, Eschborn U, Kalat M:

Near triploidy in a feline fibrosarcoma.

J Vet Med Assoc. 1991 Oct; 38(8): 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.

J Vet Med Assoc. 1994 Apr; 41(3):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 Nov-Dec; 151(6): 707-13

Mayr B, Bockstahler B, Loupal G, Reifinger M, Schleger W:

Cytogenetic variation between four cases of feline fibrosarcoma.

Res Vet Sci. 1996 Nov; 61(3): 268-70

Mary 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 Jun ;22(4):249-55

Mayr B, Blausteiner J, Edlinger a, Reifinger M, Alton K, Schaffner G,

Brem G:

Presence of p53 mutations in feline neoplasms.

Res Ver Sci. 2000 Feb; 68(1) 63-70

McEntee MC:

The utility of contrast enhanced computed tomography in feline vaccine associated sarcomas: 35 cases.

Vet Radiol Ultrasound 2000;41(6):575

McEntee MC, Page RL:

Feline vaccine-associated sarcomas.

J Vet Intern Med. 2001 May-June;15(3):176-82

McNiel EA:

Charaterization of chromosomal aberations in feline vaccine-associated sarcoma using comparative genomic hybridization.

ACVIM; 2001

Metcalf D:

The molecular biology and functions of the granulocyte-makrophage colony-stimulating factors.

Blood. 1986; 67(2): 257-67

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(12):1617-22

Mosmann TR, Coffman RL:

TH1 and TH2 cells: different patterns of Lymphokine secretion lead to different functional properties.

Annu Rev Immunol. 1998;7:145-73

Nadal E, Fowler A, Kanfer E, Apperly J, Goldman J, Dazzi F:

Adjuvant interleukin-2 therapy for patients refractory to donor lymphocyte infusions.

Exp Hematol 2004;32(2); 218-23

Nambiar PR, Haines DM, Ellis JA, Kidney BA, Jackson ML:

Mutational analysis of tumour suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas.

AM J Vet Res. 2000 Oct;61(10):1277-81

Nambiar PR, Jackson ML, Ellis JA, Chelack BJ, Kidney BA, Haines DM:

Immunohistochemical detection of tumour suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas.

Vet Pathol. 2001 Mar;38(2):236-8

Newman CM, Lawrie A, Brisken AF, Cumberland DC:

Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality.

Echocardiography 2001; 18(4):339-47

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;Nov; 40(6): 651-8

Niidome T, Huang L:

Gene therapy progress and prospects: issues in assay development.

Methods Mol Biol 2005; 302: 167-78

O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F:

The Fas counterattack: cancer of a site of immun privilege.

Immunol Today. 1999; 1(1);31-52

O'Rourke K:

Controversy, confusion continue to surround vaccine guidelines.

J Am Vet Med Assoc. 225: 814-15

Ortmann U:

Die Hauttumoren der Katze unter besonderer Berücksichtigung der Fibrosarkome. Vet Med Diss, München 1986

Parmiani G, Rodolfo M, Melani C:

Immunological gene therapy with ex vivo gene-modified tumor cells: a critique and a reappraisal.

Hum Gene Ther 2000; 11: 1269-75

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 Jan,134(1):95-104

Plumas J, Jacob MC, Chaperot L, Molens JP, Sotto JJ, Bensa JC:

Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95(Fas/Apo-1)-mediated apoptosis.

Blood. 1998;91(11):2875-85

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 sarcomas in cats.

J Vet Intern Med 2002; 16(6):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 Dec;3(12):1104-12

Ribas A, Butterfield LH, Economou JS:

Genetic immunotherapy for cancer.

Oncologist. 2000;5(2):87-98

Romanelli G, Marconato L, Olivero D, Massari F, Zini E :

Analysis of prognostic factors associated with the injection-site sarcoma in cats: 57 cases (2001-2007).

J AM Vet Med Assoc 2008 Apr 15;232(8):1193-9

Roitt IM, Brostoff J, Male KM:

Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Thieme Verlag Stuttgart, deutsche Übersetzung 1995; 19-20.

Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold PM, Linehan WM,

Seipp CA, White DE:

Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients.

Ann Surg. 1989; 210(4): 474-84

Ryan CW, Vogelzang NJ, Dumas MC, Kuzel T, Stadler WM:

Granulocyte- macrophage-colony stimulating factor in combination immunotherapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: results of two phase II clinical trials.

Cancer 2000, 88(6): 1317-24

Saba C, Kosarek C, Northrup N, Thamm DH, Vail DM, Chun R:

Phase II clinical evaluation of lomustine chemotherapy for feline vaccine-associated sarcomas.

Jul 15,2009, [www. catvets.com](http://www.catvets.com)

Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergmann , Kruger A, Gansbacher B, Plank C:

Magnetofektion: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo.

Gene Ther 2002; 9(2): 102-9

Schmidt W, Schweighoffer T, Herbst E, Maass G, Berger M, Schilcher F, Schaffner G, Birnstiel ML:

Cancer vaccines: the interleukin 2 dosage effect.

Proc Natl Acad Sci USA 1995 May 9;91(10): 4711-4

Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ:

T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.

Nature. 1998; 393(6684):480-3

Schwartz RN, Stover L, Dutcher J:

Managing toxicities of high-dose interleukin-2.

Oncology (Huntingt) 2002; 16(11 Suppl 13):11-20

Schwarz B, Kempf T, Schillinger U, Brill T, Plank C, Köstlin R, Gänsbacher 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 Jul;32(4):983-95,viii

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 spontaneous arising feline soft tissue sarcomas.

Molecular cancer therapeutics. 2007 Jan;6(1):380-9

Simon D, Culmsee K, Schoenrock D, Mellin A, Eickhoff M, Nolte I:

Einsatz der Radiotherapie in der Veterinärmedizin.

Tierärztl Prax 2001;29(K):92-7

Somiari S, Glassbard ML, Ernstoff MS, Silver G, Jacobs M, Hayes FA, Soong SL:

Theory and in vivo application of electroporative gene delivery.

Mol Ther 2000;2(3): 178-87

Spugnini EP, Baldi A, Vincenzi B, Bongiorno F, Bellelli C, Citro G,

Porrello A:

Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: a perliminary stdy in a spontaneous feline model.

Cancer Chemother Pharmacol 2007;59(3):35-40

Stigmair-Herb MT:

Hauttumoren bei Katzen-eine retrospektive Studie.

Tierärztliche Umschau 1987; 42: 681-686

Suit HD, Mankin HJ, Wood WC, Proppe KH:

Preoperative, intraoperative and postoperative radiation in the treatment of primary soft tissue sarcoma.

Cancer 1985;55(11):2659-67

Takahashi K, Harauchi D, Kimura S, Saito S, Monden Y:

OK-432 developes CTL and LAK activity in mononuclear cells from regional lymph nodes of lung cancer patients.

Int J Immunopharmacol. 1998; 20(8):375-88

Tizard IR: Resistance to tumors.

In: Merchant T, editor. Veterinary Immunology: An introduction.

Seventh ed. Phiadelphia: Elsevier;2004.

VAFSTF: Vaccine-Associated Feline Sarkoma Task Force guidelines:

Diagnosis and treatment of suspected sarcomas.

J Am Vet Med Assoc 1999; 214(12): 1745

Vail DM, Mac Ewen EG:

Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer.

Cancer Invest 2000; 18(8): 781-92

van Haelst Pisani C, Kovach JS, Kita H, Leiferman KM, Gleich GJ, Silver JE, Dennin R, Abrams JS:

Administration of interleukin-2 (IL-2) results in increased plasma concentrations of IL-5 and eosinophilia in patients with cancer.

*Blood.*1991 Sep; 78(6):1538-44.

van Seventer GA, Shimitzu Y, Shaw S:

Role of multiple accessory molecules in T-cell activation.

Curr Opin Immunol. 1991;3(3):294-303

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(6): 618-20

Wiedmann K:

Klinische Phase I-Studie zur neoadjuvanten immunstimulierenden Therapie des feline Fibrosarkoms mit Interleukin-2 und Interferon-gamma.

(Diss.med.vet.) München: Ludwig-Maximilian-Universität;2005

Wieland S:

Klinische Phase I-Studie zur genterapeutischen Immunstimulation durch Interleukin-2 und Interferon-gamma als adjuvante Behandlung des feline Fibrosarkoms.

(Diss. med.vet.) München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2002

Williams LE, Banerji N, Klausner JS, Kapur V, Kanjilal S:

Establishment of two vaccine-associated feline sarcoma cell lines and determination of in vitro chemosensitivity to doxorubicin and mitoxantrone.

Am J Vet Res 2001;62(9): 1354-7

Yang JP, Huang L:

Direkt gene transfer to mouse melanoma by intratumoral injection of free DNA.

Gene Ther 1996; 3(6): 542-8

IX. ANHANG

Anhang 1: Informationsschreiben für praktische Tierärzte



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

ADRESSE

Mai 2008

Fibrosarkom-Gentherapie

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

mit erheblichen Neuerungen geht die Gentherapiestudie ununterbrochen weiter. Die Arbeitsgruppe hat die felines 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 6 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.

0179 1420877	Miriam Rutz	(Doktorandin)
0176 22790395	Antje Hoeksma	(Doktorandin)
0174 2399291	Prof. Dr. J. Hirschberger	
089/2180-2640	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. Katrin Hartmann

Prof. Dr. Johannes Hirschberger
Veterinärstr. 13
D-80539 München
www.medizinische-kleintierklinik.de
U-Bahn: Linie 3 und 6, Haltestelle "Universität"

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

Anhang 2: Informationsblatt für Patientenbesitzer

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

Zwanzig 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 aufgeregten 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 gentherapeutische 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.

Kontakt

Wir sind für Sie telefonisch immer erreichbar:

TÄ Cornelia Hüttinger	(0177) 6005685
TÄ Antje Hoeksma	(0176) 22790395
TÄ Miriam Rutz	(0179) 1420877
Prof. Hirschberger	(0174) 2399291
Notruf 1. Medizinische Tierklinik	(089) 2180-2650

Sie erreichen uns auch per e-mail:

info@fibrosarkom.de

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Webseite:

www.fibrosarkom.de

Anhang 3: Übersicht Kontrolluntersuchungen

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

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

Fibrosarkom-Studie

Sehr geehrte/r Frau/Herr _____

wir bitten Sie, ihre Katze _____

an den nachfolgenden Terminen zur Kontrolluntersuchung
in der 1. Medizinischen Tierklinik vorzustellen:

Tag -14:	Aufnahmeuntersuchung			
Tag -7:	am: _____	um _____	Uhr	(Studie 1)
Tag 0:	am: _____	um _____	Uhr	Abgabe OP
Tag 14:	am: _____	um _____	Uhr	Fäden ex
Tag 45:	am: _____	um _____	Uhr	Kontrolle
Tag 90:	am: _____	um _____	Uhr	Kontrolle
Tag 180:	am: _____	um _____	Uhr	Kontrolle
Tag 270:	am: _____	um _____	Uhr	Kontrolle
Tag 360:	am: _____	um _____	Uhr	Abschluss

Die dafür notwendigen Untersuchungen können ambulant durchgeführt werden,
ein stationärer Aufenthalt ist nicht erforderlich.

Bei Fragen oder Problemen stehen wir Ihnen jederzeit gerne zur Verfügung.

TÄ Miriam Rutz
TÄ Antje Hoeksma

Tel.: 0179-1420877
Tel.: 0176-22790395

Anhang 4: Einverständniserklärung

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

Institut für Exp. Onkologie und Therapieforchung
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 kompletten 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 5: VCOG-CTCAE-Tabelle mit den berücksichtigten Untersuchungsparametern und der Zuordnung in Schweregrade.

ALLERGISCHE REAKTION		CTC-GRAD
Hypersensitivität	vorübergehende Urtikaria	1
	Urtikaria, Dyspnoe	2
	symptomatische Hypotension, mit oder ohne Urtikaria, parenterale Medikamente notwendig, Ödem	3
	Anaphylaxie, die parenterale Medikamente notwendig macht	4
	Tod	5
BLUT		
Erythrozyten [x 10 ¹² /l]	5,0 -10,0	1
	3,8 - < 5,0	2
	2,5 - < 3,8	3
	1,7 - < 2,5	4
	< 1,7	5
Hämoglobin (Hb) [g/dl]	9,0 – 15,0	1
	7,0 - < 9,0	2
	5,0 - < 7,0	3
	3,5 - < 5,0	4
	< 3,5	5
Hämatokrit (Hkt) [l/l]	0,3 – 0,44	1
	0,22 - < 0,3	2
	0,13 - < 0,22	3
	0,10 - < 0,13	4
	< 0,10	5
Thrombozytose [x 10 ⁹ /l]	180 – 550	1
	> 550 – 1000	2
	> 1000	3
	-	4
	-	5
Thrombozytopenie [x 10 ⁹ /l]	180 – 550	1
	90 - < 180	2
	30 - < 90	3
	10 - < 30	4
	< 10	5
Leukozyten (gesamt) [x 10 ⁹ /l]	6,0 – 11,0	1
	4,5 - < 6,0	2
	2,0 - < 4,5	3
	0,5 - < 2,0	4
	< 0,5	5
Lymphozytose [x 10 ⁶ /l]	1000 – 4000	1
	> 4000 – 10000	2
	> 10000	3
	-	4
	-	5

Lymphozytopenie [x 10 ⁶ /l]	1000 – 4000	1
	800 - < 1000	2
	500 - < 800	3
	< 500	4
	-	5
Stabkernige Neutrophilie [x 10 ⁶ /l]	0 – 600	1
	> 600 – 3000	2
	> 3000	3
	-	4
	-	5
Segmentkernige Neutropenie [x 10 ⁶ /l]	3000 – 11000 (- 18000 erregt)	1
	2000 - < 3000	2
	1000 - < 2000	3
	500 - < 1000	4
	< 500	5
Eosinophilie [x 10 ⁶ /l]	40 – 600	1
	> 600 – 3000	2
	≥ 3000	3
	-	4
	-	5
HERZ-KREISLAUFSYSTEM		
Kapillare Rückfüllzeit	≤ 2 Sekunden	1
	≥ 2 Sekunden	2
	-	3
	-	4
	-	5
Schleimhautfarbe	blass-rosarot	1
	-	2
	blass, gerötet	3
	andere Verfärbungen	4
	-	5
KONSTITUTION		
Lethargie/ Erschöpfung	milde Lethargie	1
	moderate Lethargie, die Katze zeigt normales Sozial-, Fress- und Ruheverhalten	2
	gefährdet, schwere Einschränkung bei Lebensaktivität, ambulatorische Behandlung notwendig bis zur Wiederaufnahme der Lebensaktivität	3
	schwerbeschädigt, Zwangsfütterung und Unterstützung bei Lebensaktivität notwendig	4
	Tod	5
Körpertemperatur [°C]	> 39,0 - 40,0	1
	> 40,0 - 41,0	2
	> 41,0 - 42,0	3
	> 42,0	4
	Tod	5

Gewichtszunahme [%]	< 5	1
	> 5 – 10	2
	> 10 – 20	3
	> 20	4
	-	5
Gewichtsverlust [%]	< 5	1
	5 – 10	2
	> 10 – 20	3
	> 20	4
	-	5
HAUT		
Infizierte Wundheilungsstörung	Gewebsentzündung mit unspezifischen Entzündungszeichen	1
	oberflächliche Infektion	2
	starke Infektion, Antibiose erforderlich	3
	in die Tiefe reichende Wundinfektion	4
	-	5
Nichtinfizierte Wundheilungsstörung	geringgradige Nahtdehiszenz der Hautnaht	1
	Nahtdehiszenz bei intakter Unterhautnaht	2
	Nahtdehiszenz auch der Unterhautnaht, kein Organvorfall	3
	Nahtdehiszenz auch der Unterhautnaht mit Organvorfall	4
	-	5
MAGEN-DARM-TRAKT		
Anorexie	Überredung oder Ernährungswechsel notwendig um Appetit aufrechtzuerhalten	1
	veränderte Nahrungsaufnahme (<3 d) ohne signifikanten Gewichtsverlust, orale Ernährungsunterstützung indiziert	2
	Dauer von 3-5 Tagen, Gewichtsverlust oder Malnutrition	3
	lebensbedrohlich, Dauer von 3 – 5 Tagen	4
	Tod	5
Obstipation	gelegentliche Symptome, Laxantien/Klistiere indiziert	1
	persistierende Symptome, Laxantien/Klistiere permanent	2
	manuelle Entleerung notwendig, Lebensqualität	3
	lebensbedrohlich, Megakolon, Obstruktion	4
	Tod	5
Durchfall	Erhöhung vom Ausgangswert um > 2 Stühle pro Tag	1
	Erhöhung vom Ausgangswert um 2 – 6 Stühle pro Tag	2
	Erhöhung vom Ausgangswert um > 6 Stühle pro Tag, intravenöse Flüssigkeitssubstitution > 24 h notwendig	3
	lebensbedrohlich, hämodynamischer Kollaps	4
	Tod	5
Emesis	< 3 Episoden in 24 Stunden	1
	3 – 5 Episoden in 24 Stunden, parenterale Flüssigkeit für < 24 Stunden	2
	> 5 Episoden in 24 Stunden, parenterale Flüssigkeit für > 24 Stunden	3
	lebensbedrohlich, hämodynamischer Schock	4
	Tod	5

Palpation des Abdomens	geringgradige Abwehrspannung	1
	mittelgradige Abwehrspannung	2
	Abwehrbewegung bei Palpation	3
	Schmerzäußerung bei Palpation	4
	-	5
BLUTUNGEN		
Epistaxis	schwach, keine Transfusion erforderlich	1
	mittelgradig, keine Transfusion erforderlich	2
	stark, Transfusion erforderlich	3
	unstillbare Blutung, Transfusion erforderlich	4
	Tod	5
Hämatemesis	schwach, keine Transfusion erforderlich	1
	mittelgradig, keine Transfusion erforderlich	2
	stark, Transfusion erforderlich	3
	unstillbare Blutung, Transfusion erforderlich	4
	Tod	5
Meläna	schwach, keine Transfusion erforderlich	1
	mittelgradig, keine Transfusion erforderlich	2
	stark, Transfusion erforderlich	3
	unstillbare Blutung, Transfusion erforderlich	4
	Tod	5
LEBER		
Aspartat-Amino-Transferase (AST) [IU/l]	≤ 30	1
	> 30 – 75	2
	> 75 – 150	3
	>150 – 600	4
	> 600	5
Alanin-Amino-Transferase (ALT) [IU/l]	≤ 70	1
	> 70 – 175	2
	> 175 – 350	3
	> 350 – 1400	4
	> 1400	5
Hyperbilirubinämie [μmol/l]	≤ 3,4	1
	> 3,4 – 33,9	2
	> 33,9 – 67,8	3
	> 67,8 – 101,7	4
	> 101,7	5
Hypoalbuminämie [g/l]	26 – 56	1
	22 - < 26	2
	18 - < 22	3
	< 18	4
	-	5
STOFFWECHSEL		
Hypertriglyzeridämie [mmol/l]	0,29 - 3,88	1
	3,88 - 9,7	2
	> 9,7 - 19,4	3
	> 19,4 – 38,8	4
	> 38,8	5

Hyperglycämie [mmol/l]	3,1 – 6,9	1
	> 6,9 – 17,25	2
	> 17,25 – 34,5	3
	> 34,5 – 69	4
	> 69	5
Fructosamin [µmol/l]	≤ 340	1
	> 340	2
	-	3
	-	4
	-	5
NERVENSYSTEM		
Ataxie	geringgradige Symptome mit Beeinträchtigung des Bewegungsablaufes	1
	milde Symptome mit Störungen des Bewegungsablaufes	2
	mittelgradige Symptome, starkes Schwanken und Umfallen	3
	kein Stehvermögen	4
	-	5
Bewusstseins- trübung	Bewusstseinsstörung, Sedation	1
	Benommenheit, Aufwecken möglich	2
	Koma, kein Aufwecken möglich	3
	-	4
	-	5
Nystagmus	vorhanden	1
	-	2
	-	3
	-	4
	-	5
Synkope	vorhanden	1
	-	2
	-	3
	-	4
	-	5
Tremor	mild und kurz anhaltend oder periodisch	1
	mittelgradig, keine Störung der physiologischen Aktivität	2
	hochgradige Störung der physiologischen Aktivität	3
	-	4
	-	5
AUGE		
Katarakt	milde Symptome	1
	mittelgradige Symptome	2
	Erblindung	3
	-	4
	-	5
Konjunktivitis	milde Symptome	1
	mittelgradige Symptome	2
	Erblindung	3
	-	4
	-	5

Trockenen Auge	milde Symptome, keine Behandlung notwendig	01
	mittelgradige Symptome, medikamentöse Behandlung erforderlich	2
	hochgradige Symptome, medikamentöse Behandlung erforderlich	3
	-	4
	-	5
Keratitis	milde Symptome	1
	mittelgradige Symptome	2
	hochgradige Symptome	3
	-	4
	-	5
Tränenfluss	milde Symptome, keine Beeinflussung der Augenfunktion	1
	mittelgradige Symptome, Beeinflussung der Augenfunktion	2
	hochgradige Symptome	3
	-	4
	-	5
ATMUNGSAPPARAT		
Apnoe	-	1
	-	2
	Apnoe episodenhaft vorhanden	3
	Apnoe dauerhaft vorhanden, Intubation und Beatmung erforderlich	4
	Tod	5
Tussis	milde Symptome	1
	mittelgradige Symptome, Therapie erforderlich	2
	schwerer Husten, therapeutisch nicht zu beeinflussen	3
	-	4
	-	5
Dyspnoe	Dyspnoe in Bewegung	1
	Dyspnoe in Ruhe	2
	-	3
	-	4
	-	5

Lungenauscultation	Kein Atemgeräusch	1
	Röntgenologische Veränderung, klinisch ohne Symptome, geringgradiges Atemgeräusch	2
	Röntgenologische Veränderungen, milde klinische Symptome, Steroide oder Diuretika erforderlich, mittelgradiges Atemgeräusch	3
	Röntgenologische Veränderungen, deutliche klinische Symptome, Steroide, Diuretika und Sauerstoffbehandlung erforderlich, deutlich obstruktives Atemgeräusch	4
	Röntgenologische Veränderungen, schwere klinische Symptome, Steroide, Diuretika und Sauerstoffbehandlung und Intubation erforderlich, hochgradiges Atemgeräusch	5
NIERE		
Kreatinin [µmol/l]	0 – 168	1
	> 168 – 252	2
	> 252 – 504	3
	> 504 – 1008	4
	> 1008	5
Hämoglobinurie	nicht vorhanden	1
	Vorhanden	2
	-	3
	-	4
	-	5
Inkontinenz	Keine	1
	-	2
	-	3
	unkontrollierter Harnabsatz	4
	-	5
Nierenversagen	Kein	1
	-	2
	-	3
	Nierenversagen reversibel nach Infusionstherapie	4
	Nierenversagen irreversibel nach Infusionstherapie	5
Harnabsatz	Normal	1
	vermehrter Harnabsatz	2
	deutlich vermehrter Harnabsatz	3
	-	4
	-	5
Harnretention	Keine	1
	-	2
	Katheterisierung ≤ viermal pro Woche	3
	Katheterisierung > viermal pro Woche	4
	Blasenruptur	5

X. DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Prof. Dr. vet.med. Johannes Hirschberger danke ich für die Möglichkeit zur Teilnahme an diesem spannenden Projekt. Einen großen Dank für die zügige und gewissenhafte Korrektur der Doktorarbeit sowie für die hervorragende Betreuung.

Einen besonderen Dank gilt dem gesamten Onko-Team, insbesondere den Residents Isabella Zenker und Tina Meichner für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Betreuung unserer Katzen als auch meinen FSA-Kolleginnen Miriam Rutz und Ulrike Schillinger für die gute Einarbeitung und Unterstützung im Team.

Frau Prof. Dr. Hartmann danke ich für ihre Unterstützung in der gesamten Fibrosarkomstudie.

Großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Köstlin für seine Mühe bei den vielen Operationen der Studientiere. Auch dem gesamten Team der Anästhesie und Chirurgie der gynäkologischen und chirurgischen Kleintierklinik danke ich für ihren Einsatz sehr.

Vielen Dank an alle Tierärzthelfer und Tierärzthelferinnen für ihre liebevolle und aufopferungsvolle Mithilfe bei der Versorgung und Überwachung der Patienten.

Ein großes Dankeschön gilt auch den Labormitarbeitern, die durch ihre Unterstützung und ihren Einsatz zum Gelingen der Studie mit beigetragen haben.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. Carola Sauter-Louis für ihre Hilfe und ihre Geduld bei der statistischen Auswertung der Studientiere.

Ich danke zudem allen überweisenden Tierärzten und Tierärztinnen für die kollegiale und verlässliche Zusammenarbeit. Ein großer Dank geht auch an alle Katzenbesitzer, durch deren Vertrauen und ihr regelmäßiges Erscheinen die Grundlage für diese Studie geschaffen wurde.

Ich danke Katja Krüger, Nadine Hettich, Carolin Schmidt und Jennifer Schnauer für ihre treue und sehr tiefe Freundschaft.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, als wertvollsten Menschen in meinem Leben, für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen auf all meinen Wegen.