

Behandlung des caninen Hämangiosarkoms der Milz mit
autologer Tumorstoffimpfung auf Basis von ungeprägten
monozytären dendritischen Zellen – eine randomisierte
placebokontrollierte Doppelblindstudie

von Amalia Reck

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

Behandlung des caninen Hämangiosarkoms der Milz mit
autologer Tumorstoffimpfung auf Basis von ungeprägten
monozytären dendritischen Zellen – eine randomisierte
placebokontrollierte Doppelblindstudie

von Amalia Reck
aus Freiburg

München 2024

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

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Angefertigt in der Tierklinik Hofheim

Mentor: Dr. Martin Kessler

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Tag der Promotion: 6. Juli 2024

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Canines Hämangiosarkom der Milz	3
1.1. Ursprungszelle und Onkogenese des HSA	3
1.2. Epidemiologie	3
1.3. Ätiologie	3
1.4. Biologisches Verhalten	4
1.5. Klinik und Laborbefunde.....	4
1.6. Diagnose und Stadieneinteilung	5
1.7. Prognose	6
2. Therapie des caninen Hämangiosarkoms	7
2.1. Chirurgie	7
2.2. Systemische Therapie	8
2.2.1. Chemotherapie	8
2.2.2. Kleinmolekulare Therapie (Targeted Therapy)	9
2.2.3. Immuntherapie	10
3. Dendritische Zelltherapie	11
3.1. Humanmedizin	12
3.2. Tiermedizin	13
3.2.1. PetBioCell	14
III. PUBLIKATION.....	16
IV. DISKUSSION.....	25
V. ZUSAMMENFASSUNG	35
VI. SUMMARY.....	37
VII. LITERATURVERZEICHNIS.....	38
VIII. DANKSAGUNG.....	45

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CD	Cluster of Differentiation
cDC	konventionelle dendritische Zellen
COX-2-I	Cyclooxygenase-2-Inhibitor
CTX	Cyclophosphamid
DC	Dendritische Zellen
DCT	dendritische Zelltherapie
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnungsstörung
DOX	Doxorubicin
FDA	Food and Drug Administration
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor
HSA	Hämangiosarkom
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitor
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2/-4/-6	Interleukon-2/-4/-6
KIT	Rezeptor des Stammzellfaktors
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
L-MTP-PE	Liposomales Muramyltripeptid Phosphatidylethanolamin
MC	metronomische Chemotherapie
MDSC	myeloide Suppressorzellen
MDT	maximal tolerierte Dosis
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
moDC	Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen
PB	Placebo

PBMC	periphere Blut-mononukleäre Zellen
PD-1	Programmed cell death protein 1
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
PGE2	Prostaglandin-E2
PDGFR	Rezeptor des Plättchenwachstumsfaktor
Tc-Zellen	zytotoxische T-Zellen
TH-Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TME	Tumormikromilieu
TMF	tumorfreie Zeit
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	regulatorische T-Zellen
ÜZ	Überlebenszeit/en
VCR	Vincristin
VEGFR	Rezeptor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors

I. EINLEITUNG

Hämangiosarkome (HSA) sind hochmaligne mesenchymale Tumoren, welche 2 % aller Hundetumoren ausmachen (Vail und Withrow, 2019). Sie werden vor allem in der Milz und insbesondere bei großen (median 26-29 kg) und älteren (median 10 Jahre) Hunden diagnostiziert (Brown et al., 1985; Mullin und Clifford, 2019; Smith, 2003). Von allen Weichteilsarkomen zeigen HSA der Milz die höchste Metastasierungsneigung. Die Metastasierung erfolgt bevorzugt hämatogen in Lunge, Leber, Herz und anderen Organen sowie durch intrakavitäre Implantation in die abdominalen serösen Häute nach Ruptur des Milztumors (Alvarez et al., 2013; Mullin und Clifford, 2019). Die klinischen Symptome nicht-rupturierter HSA sind unspezifisch, häufig kommt es jedoch zur Ruptur des Milztumors mit Hämoperitoneum, was in einem akuten Schwächeanfall bzw. hypovolämischem Schock resultiert (Batschinski et al., 2018; Mullin und Clifford, 2019). Therapie der Wahl ist die Splenektomie, allerdings liegen die medianen Überlebenszeiten aufgrund der hohen Metastasierungsneigung bei nur ca. 2-3 Monaten (Kim et al., 2007; Wendelburg et al., 2015; Wood et al., 1998). Zur Verbesserung der Überlebenszeiten (ÜZ) wird eine adjuvante Chemotherapie empfohlen (Batschinski et al., 2018; Clifford et al., 2000; Ogilvie et al., 1996), doch auch diese verlängert die medianen ÜZ nur auf ca. 5-8 Monate (Kim et al., 2007; Ogilvie et al., 1996; Sorenmo et al., 2004; Wendelburg et al., 2015). Aus diesem Grund wurden bereits früh auch adjuvante immuntherapeutische Behandlungsstrategien verfolgt. Die bislang längsten beschriebenen ÜZ von Hunden mit HSA der Milz konnten mit einer Kombination aus Chemotherapie, (Doxorubicin (DOX)/Cyclophosphamid (CTX)) und Immuntherapie mit dem Makrophagenaktivator „Liposomales Muramyltripeptid Phosphatidylethanolamin“ (L-MTP-PE) erreicht werden (Vail et al., 1995).

Seit einigen Jahren wird in Deutschland von der Firma PetBioCell eine autologe dendritische Zelltherapie (DCT) für die Tumorbehandlung bei Tieren kommerziell angeboten. Aus dem eingesandten Patientenblut werden Monozyten isoliert und mithilfe von Zytokinen zu dendritischen Zellen (DC) gereift. Diese werden dem Patienten anschließend intradermal injiziert (<https://www.petbiocell.de/dendritische-zelltherapie>). In einem Kongressbeitrag berichtet PetBioCell bei 10 Hunden mit HSA der Milz nach Splenektomie und

adjuvanter Behandlung mit DCT von einer medianen ÜZ von 458 Tagen (Grammel, 2016), was die bisher in der Literatur beschriebenen ÜZ von Patienten mit adjuvanter Chemotherapie deutlich übertrifft. Allerdings wurden bislang keine Arbeiten in peer-reviewed Fachzeitschriften veröffentlicht, die die Wirksamkeit dieser Therapie beim HSA der Milz des Hundes wissenschaftlich belegen.

Primäres Ziel dieser klinischen Studie war es deshalb, anhand einer prospektiven, placebokontrollierten Doppel-Blind-Studie die Wirksamkeit der DCT der Firma PetBioCell bei Hunden mit nicht-metastasiertem HSA der Milz zu überprüfen. Zudem sollten eventuelle Nebenwirkungen nach Injektion einer DCT beschrieben und mit einer Kontrollgruppe verglichen werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Canines Hämangiosarkom der Milz

1.1. Ursprungszelle und Onkogenese von HSA

Früher ging man davon aus, dass HSA durch die maligne Transformation von Endothelzellen entstehen. Neue Erkenntnisse der letzten Jahre legen die Vermutung nahe, dass die Tumorerkrankung aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks hervorgeht. Diese migrieren zu vaskularisierten Bereichen und es kommt zur malignen Entartung (Kim et al., 2015; Lamerato-Kozicki et al., 2006).

1.2. Epidemiologie

HSA machen 2 % aller Hundetumore aus (Vail und Withrow, 2019), treten am häufigsten in der Milz, aber auch im rechten Herzvorhof, in der Leber, Haut, Unterhaut und Muskulatur auf (Griffin et al., 2021). In einer Untersuchung von Eberle et al. (2012) waren ca. 50 % aller Milztumoren maligne, davon waren 73,5 % HSA. Hingegen wurde in einer anderen Untersuchung bei nicht-rupturierten Milztumoren nur in 29,5 % der Fälle eine maligne Neoplasie diagnostiziert, bei 58 % handelte es sich um ein HSA (Cleveland und Casale, 2016). Epidemiologisch wird häufig auf die doppelte 2/3-Regel hingewiesen (Davies and Taylor, 2020; Mullin und Clifford, 2019). Diese besagt, dass 2/3 aller rupturierten Milztumoren maligne sind und dass es sich bei 2/3 dieser um HSA handelt. Allerdings wird diese Regel kontrovers diskutiert. Schick und Grimes (2022) beispielsweise diagnostizierten bei fast 90 % der rupturierten malignen Milztumore HSA.

1.3. Ätiologie

Die genaue Ursache für die Entstehung eines HSA ist weiterhin unklar. Es wird ein komplexes multifaktorielles Geschehen vermutet. Bestimmte Rassen wie z. B. deutsche Schäferhunde, Retriever (Golden und Labrador Retriever) sind in vielen Studien überrepräsentiert (Griffin et al., 2021; Mullin und Clifford, 2019), weshalb auch eine genetische Komponente angenommen wird. Insbesondere ältere (median 10 Jahre) und größere Hunde (median > 25 kg) erkranken an HSA (Carnio et al., 2020; De Nardi et al., 2023; Sherwood et al., 2016). Ein weiterer vermuteter Faktor ist der hormonelle Status des Hundes, da Studien ein erhöhtes Risiko für diese Erkrankung bei kastrierten Patienten zeigen (Carnio et al., 2020; Prymak et al.,

1988; Robinson et al., 2020). In einigen Studien waren männliche Hunde überrepräsentiert (Brown et al., 1985; Schultheiss, 2004). Umweltfaktoren, wie z. B. vermehrte Exposition von UV-Licht bei v. a. hellen und kurzhaarigen Hunden wird bei der Entstehung kutaner HSA diskutiert (Mullin und Clifford, 2019). Seit Kurzem rücken auch infektiöse Erkrankungen (z. B. Bartonella spp.) als Ursache für die Entstehung von HSA näher in den Fokus (Kim et al., 2015).

1.4. Biologisches Verhalten

HSA der Milz sind hochmaligne Tumoren, die zu einer frühzeitigen Metastasierung neigen. Diese erfolgt insbesondere hämatogen oder intrakavitär nach Ruptur des Milztumors. Am häufigsten treten Metastasen in Leber, Herz und Lunge sowie als Implantationsmetastasen auf den serösen Häuten des Abdomens auf (Griffin et al., 2021). Zudem neigt der Tumor zur Metastasierung in die graue Substanz des Gehirns (Waters et al., 1989). Bei Hunden mit HSA wurde ein zeitgleiches Auftreten einer Masse am rechten Herzvorhof und der Milz beschrieben. Bei Boston et al. (2011) fand sich dies bei 8,7 % der Fälle.

Zudem stellen HSA der Milz die häufigste Ursache für einen nicht-traumatischen Hämaskos dar (Eberle et al., 2012; Hammond und Pesillo-Crosby, 2008).

1.5. Klinik und Laborbefunde

Bei nicht-rupturierten Tumoren sind die Symptome unspezifisch (Griffin et al., 2021). Die Patienten können aufgrund von Lethargie, Schwäche, Inappetenz, Gewichtsverlust oder gastrointestinaler Symptome (Vomitus, Diarrhoe) vorgestellt werden. Am häufigsten ist ein akuter Schwächeanfall oder ein hypovolämischer Schock, bedingt durch die Ruptur des Milztumors mit nachfolgender intraabdominaler Blutung (Mullin und Clifford, 2019). In der klinischen Untersuchung können bei diesen Patienten blasse Schleimhäute, Hinweise für eine Hypovolämie, ein umfangsvermehrtes (ggf. undulierendes) Abdomen oder Arrhythmien auffallen.

In der Hämatologie fallen v. a. eine Anämie (meist regenerativ oder bei akuter Blutung noch aregenerativ), eine Thrombozytopenie und/oder eine Neutrophilie auf. Bei weiterer Abklärung des Gerinnungsstatus kann eine disseminierte intravasale Gerinnungsstörung (DIC) diagnostiziert werden (Hammer et al., 1991; Maruyama et al., 2004). Die Blutchemie ist meist unspezifisch verändert, häufiger zeigt sich eine Hypoalbuminämie oder erhöhte Leberenzyme.

1.6. Diagnose und Stadieneinteilung

Bei der Ultraschalluntersuchung des Abdomens lässt sich eine heterogene und oft kavernöse Masse und ggf. anechogener Aszites nachweisen. Die Sonographie ist zur Beurteilung der Dignität von Milzmassen allerdings nicht ausreichend spezifisch. Yankin et al. (2020) befanden in ihrer Studie, dass größere Milzherde (1-2 cm), Aszites und > 1 „Target-Läsionen“ hinweisend auf eine klinisch relevante Erkrankung sein können. Weitere bildgebende Verfahren wie z. B. die Computertomographie können insbesondere mittels der Kontrastmittelphasen auf ein malignes Geschehen hinweisen, eine sichere Diagnose ist jedoch nicht möglich (Kutara et al., 2017). Eine Feinnadelaspiration ist aufgrund der geringen Exfoliation der Zellen, der Gefahr für Implantationsmetastasen und einer Tumorruptur nicht zu empfehlen. Der Goldstandard zur finalen Diagnosestellung ist die pathologisch-histologische Untersuchung des Milzherdes.

Vor Durchführung einer Operation sollte ein Metastasenscreening erfolgen. Hierfür werden Röntgenaufnahmen des Thorax (in mindestens 2 Ebenen) und insbesondere eine Beurteilung der Leber und der anderen Organstrukturen, einschließlich des Omentums, im Rahmen der abdominalen Ultraschalluntersuchung empfohlen. Häufig wird im Rahmen des Stagings auch eine Echokardiographie durchgeführt. Diese Empfehlung beruht auf einer älteren Studie, bei der in 25 % der Fälle von Milz-HSA auch gleichzeitig eine Masse am rechten Herzvorhof auftrat (Waters et al., 1988). Aufgrund der bereits erwähnten neueren Studie von Boston et al. (2011), welche ein 8,7 %-Risiko ermittelte, wird eine Echokardiographie im Rahmen des Stagings seltener durchgeführt.

Nach definitiver Diagnose und dem Staging wird für die HSA eine Stadieneinteilung mittels TNM-Klassifikation durchgeführt (Vail and Withrow, 2019, s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Klinische Stadieneinteilung für canine HSA:**Primärtumor (T)**

T ₀	makroskopisch kein Tumor
T ₁	Tumor unter 5 cm Durchmesser und auf Milz beschränkt
T ₂	Tumor \geq 5cm oder rupturiert
T ₃	Tumor infiltriert umliegende Strukturen

Regionale Lymphknoten (N)

N ₀	keine Lymphknotenmetastasen nachweisbar
N ₁	Metastase im regionalen Lymphknoten
N ₂	Metastasen in entfernten Lymphknoten

Fernmetastasen (M)

M ₀	keine Fernmetastasen nachweisbar
M ₁	Fernmetastasen

Stadieneinteilung

Stadium I	T ₀ oder T ₁ , N ₀ , M ₀
Stadium II	T ₁ oder T ₂ , N ₀ oder N ₁ , M ₀
Stadium III	T ₂ oder T ₃ , jedes N, M ₁

1.7. Prognose

Die Prognose ist insgesamt sehr vorsichtig. Die medianen ÜZ nach alleiniger Splenektomie liegen bei ca. 19-86 Tagen (Brown et al., 1985; Kim et al., 2007; Prymak et al., 1988; Wood et al., 1998). Die 1-Jahres-ÜZ liegt bei unter 10 % (Mullin und Clifford, 2019). Dies ist v. a. auf die meist bereits erfolgte Mikrometastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose zurückzuführen. Mit einer adjuvanten Chemotherapie (meist anthracyclinhaltige Protokolle) lässt sich die mediane ÜZ auf 5-8 Monaten verbessern (Faulhaber et al., 2021; Wendelburg et al., 2015).

Einige Studien zeigen eine Abhängigkeit der Prognose vom Erkrankungsstadium (Bray et al., 2018; Matsuyama et al., 2017; Wendelburg et al., 2015), wobei deutlich längere ÜZ von Patienten in den Stadien I und II im Vergleich zu Patienten mit bereits erfolgter Metastasierung (Stadium III) beschrieben wurden. Allerdings konnte diese prognostische Relevanz in anderen Studien nicht belegt werden (Alvarez et al., 2013; Sorenmo et al., 2007; Wood et al., 1998).

Als negativ prognostisch bewertet wird zudem das Vorhandensein einer Anämie und/oder Thrombozytopenie zum Zeitpunkt der Diagnose (Masyr et al., 2021) sowie die Notwendigkeit einer Bluttransfusion (De Nardi et al., 2023). Auch ein erhöhter mitotischer Index ist mit einer schlechteren Prognose verbunden (Kim et al., 2007; Moore et al., 2017).

2. Therapie des caninen HSA der Milz

2.1. Chirurgie

Standardtherapie beim HSA der Milz ist die Splenektomie. Zum einen ist zur sicheren Diagnose eine histopathologische Untersuchung der Milz notwendig, zum anderen werden die erkrankten Hunde häufig im akuten Geschehen aufgrund eines rupturierten Milztumors vorgestellt. Einzige lebensrettende Maßnahme ist in diesen Fällen die Milzexstirpation. Im Rahmen der Operation kann zudem durch die makroskopische Untersuchung der anderen Abdominalorgane (insbesondere Leber und Omentum) ein sichereres Staging erreicht werden. Bei Auftreten von Veränderungen in anderen Organen sollten zur weiteren Abklärung im Rahmen der Operation Biopsieentnahmen erfolgen. Bei Wood et al. (1998) zeigten z. B. 20 von 32 Patienten Veränderungen in der Leber, dennoch wurden bei keinem dieser Hunde Metastasen pathohistologisch bestätigt. Auch in einer anderen Studie von 2014 hatten nur 50 % der Patienten mit Leberveränderungen letztendlich pathohistologisch bestätigte Metastasen. Die Lebermetastasen waren meist multipel, dunkel verfärbt und zeigten eine aktive Blutung (Clendaniel et al., 2014).

Die perioperative Mortalität bei Splenektomien lag in einer Studie von Wendelburg et al. (2014) bei 7,6 %. Die häufigsten Ursachen für ein peri- oder postoperatives Versterben waren Thromboembolien, Koagulopathien und unkontrollierte Blutungen von Metastasen. Ein erhöhtes Risiko zeigt sich bei Patienten mit starken Thrombozytopenien und Anämien sowie bei Auftreten von intraoperativen ventrikulären Arrhythmien (Michael et al., 2023; Wendelburg et al., 2014).

Leider handelt es sich bei der Milzexstirpation nur um eine palliative Maßnahme, da die mediane ÜZ nach alleiniger Splenektomie nur bei 86 Tagen und die 1-Jahres-ÜZ nur bei 6,5 % liegt (Wood et al., 1998). Dennoch zeigte sich in dieser Studie, dass die Patientenbesitzer den Eingriff trotz Diagnose nicht bereuten und von einer sehr guten Lebensqualität nach der Operation berichteten.

2.2. Systemische Therapie

Aufgrund des hochmalignen Verhaltens der HSA der Milz wird seit Jahren nach adjuvanten systemischen Therapien zur Verbesserung der ÜZ geforscht. In vielen Studien konnte bereits die Effektivität einer adjuvanten Therapie bestätigt werden (Batschinski et al., 2018; Clifford et al., 2000; Moore et al., 2017; Wendelburg et al., 2015). Allerdings zeigt sich eine Verlängerung der medianen ÜZ um lediglich wenige Monate (median 5-8 Monate).

2.2.1. Chemotherapie

In der Regel ist die Standardtherapie nach Splenektomie die Gabe einer Chemotherapie. In der Literatur werden am häufigsten anthracyclinhaltige Protokolle beschrieben, wie z. B. Protokolle mit DOX, Vincristin (VCR) und CTX (VAC-Protokoll) oder die Kombination von CTX und DOX (AC-Protokoll) (Clifford et al., 2000). Aber auch DOX als Monotherapie in der maximal tolerierten Dosis (MTD; 30mg/m²) wird häufig als Adjuvanttherapie verabreicht (Batschinski et al., 2018; Ogilvie et al., 1996). In den genannten Studien wurde zwar eine Verbesserung der ÜZ im Vergleich zu Patienten mit alleiniger Splenektomie beschrieben, die medianen ÜZ sind jedoch mit 141-179 Tagen immer noch niedrig. Nur 10 % der Patienten überleben das 1. postoperative Jahr (Griffin et al., 2021). Insgesamt sind die Ergebnisse bei allen angewandten Protokollen vergleichbar. Auch der Versuch einer Dosisintensivierung der DOX Monotherapie (30 mg/m² alle 2 Wochen anstelle alle 3 Wochen) (Sorenmo et al., 2004) oder die intrakavitäre Gabe von pegyliertem liposomalen DOX (Sorenmo et al., 2007) erbrachten keinen Vorteil im Vergleich zu den gängigen anthracyclinhaltigen Protokollen. Lediglich der Zeitpunkt des Beginns der Chemotherapie postoperativ erwies sich in einer neueren Studie als prognostisch. So ergab sich eine bessere ÜZ, wenn die Patienten innerhalb von 21 Tagen nach der Operation die 1. Chemotherapie erhielten im Vergleich zu Patienten, die diese erst später erhielten (Faroni et al., 2023). Hauptproblematik beim DOX ist das Risiko einer kumulativen Kardiotoxizität. Aus diesem Grund muss die Anwendung dieses Zytostatikums insbesondere bei herzkranken Patienten überdacht werden. Potentielle Alternativen sind Monotherapien mit Epirubicin und Carboplatin, beide Chemotherapeutika zeigten ähnliche ÜZ wie DOX (Faulhaber et al., 2021; Kim et al., 2007).

Die Gabe einer adjuvanten Chemotherapie bei bereits metastasierten HSA (Stadium III) wird kontrovers diskutiert. Die mediane ÜZ lag bei Patienten mit Stadium III

bei lediglich 23-68 Tagen (Batschinski et al., 2018; Kim et al., 2007). In einer neueren Studie von Marconato et al. (2019) hatten Patienten mit metastasierten HSA mit adjuvanter Chemotherapie eine bessere ÜZ als Patienten mit alleiniger Splenektomie (mediane ÜZ 140 Tage vs. 40 Tage). Allerdings traten bei 43,5 % der Patienten mit adjuvanter Chemotherapie Nebenwirkungen auf, 5 von 23 Patienten mussten stationär behandelt werden. Diese Studie zeigt, dass der Nutzen der Chemotherapie bei Patienten mit bereits erfolgter Metastasierung im Hinblick auf die möglichen Risiken bzw. Einschränkungen der Lebensqualität abgewogen werden sollte.

In den letzten Jahren wurde als Alternative die Gabe einer metronomischen Chemotherapie (MC) näher untersucht, entweder als alleinige adjuvante Therapie oder im Anschluss an einer Chemotherapie mit MTD. Bei der MC wird ein Chemotherapeutikum (i. d. R. CTX oder Chlorambucil) meist täglich in niedriger Dosis oral verabreicht. Ziel der Therapie ist die Nutzung antiangiogenetischer, immunmodulatorischer und auch zytotoxischer Effekte mit jedoch nur geringen Risiken für Nebenwirkungen. Die Wirkung bzw. der Vorteil dieser Therapie wird aufgrund der Aggressivität der HSA kontrovers diskutiert. Eine Studie konnte bei Patienten mit alleiniger MC ähnliche ÜZ wie bei der Gruppe mit MTD-Chemotherapie belegen (Treggiari et al., 2020). Hingegen zeigte sich bei Patienten mit Stadium III eine kürzere mediane ÜZ im Vergleich zu Patienten mit MTD-Chemotherapie (Marconato et al., 2019). Bei weiteren Studien erbrachte die zusätzliche Gabe einer MC nach bereits erfolgter Gabe eines anthracyclinhaltigen Protokolls kein besseres Outcome (Alexander et al., 2019; Matsuyama et al., 2017).

2.2.2. Kleinmolekulare Therapie (Targeted therapy)

Als Alternative zu klassischen Chemotherapien wurden kleinmolekulare Therapien zur Hemmung der Angiogenese erforscht. Toceranib (Palladia®, Zoetis Inc) ist eigentlich zur Behandlung von Mastzelltumoren zugelassen. Aufgrund der selektiven Hemmung verschiedener Tyrosinkinase (z. B. Rezeptor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGFR), des Plättchenwachstumsfaktors (PDGFR), des Stammzellsfaktors (KIT)), wird diese Therapie auch gerne bei anderen Tumorarten (z. B. Karzinomen, (neuro)endokrine Tumoren, gastrointestinale stromale Tumoren) eingesetzt (Maeda, 2023). Gardner et al. (2015) untersuchte den Einsatz dieses Medikaments bei Patienten mit HSA nach Splenektomie und Gabe einer Chemotherapie (DOX, 5 x alle 2 Wochen). In dieser

Studie zeigte sich jedoch keine Verbesserung der ÜZ.

Der Einsatz von Thalidomid bei Patienten mit HSA nach Splenektomie hingegen zeigte erfolgversprechende Resultate mit einer Überlebenszeit von > 1 Jahr bei 33 % der Patienten (Bray et al., 2018). Auch bei diesem Präparat werden sich bei der antitumorösen Therapie die antiangiogene Wirkung (Hemmung VEGFR) sowie zusätzlich die immunmodulatorischen und entzündungshemmenden Eigenschaften zu Nutze gemacht. Allerdings ist die Rezeptierung von Thalidomid in Deutschland aufgrund der teratogenen Wirkung streng reguliert und derzeit nur zur Behandlung bestimmter Tumorerkrankungen (z. B. Multiples Myelom) und Autoimmunerkrankungen bei Menschen zugelassen. Aus diesem Grund ist die Therapie mit Thalidomid bei Haustieren in Deutschland nicht möglich.

2.2.3. Immuntherapie

Aufgrund der bisher nur moderaten Verbesserung der ÜZ bei adjuvanter Chemotherapie wurde beim caninen HSA als Alternative auch die Immuntherapie erforscht. Ziel der Therapie ist es, die körpereigene antitumoröse Immunabwehr zu aktivieren bzw. zu unterstützen.

Bereits in den 90er-Jahren untersuchten Vail et al. (1995) den gleichzeitigen Einsatz von L-MTP-PE mit DOX-/CTX-Chemotherapie nach Splenektomie bei Patienten mit HSA der Milz. L-MTP-PE ist ein Derivat der Mycobakterien-Membran und hat immunmodulatorische Eigenschaften. Es führt zur unspezifischen Aktivierung von Monozyten und Makrophagen sowie zum Anstieg von bestimmten Zytokinen (insbesondere Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6)). In dieser Studie konnte bei Patienten die bisher beste mediane ÜZ erreicht werden (277 Tage), 37 % der Patienten waren nach einem Jahr tumorfrei. Das Medikament ist in der EU unter dem Handelsnamen Mifamurtid® für die Behandlung bestimmter Osteosarkome beim Menschen zugelassen, die extremen Kosten sind jedoch prohibitiv für die Anwendung des Medikaments in der Tiermedizin.

U'Ren et al. (2007) erforschten ein intraperitoneal appliziertes Tumorzell-Vakzin, bestehend aus zwei caninen HSA-Zelllinien sowie einem DNA-Liposomen-Komplex als Adjuvans. Auch diese Patienten wurden parallel mit einer Chemotherapie (DOX) behandelt. Eine gesteigerte humorale Immunantwort konnte nachgewiesen werden, dennoch zeigten sich keine bessere ÜZ im Vergleich zur ausschließlich mit Chemotherapie behandelten Hunden.

In einer jüngeren Phase-II-Studie zeigten sich vielversprechende Ergebnisse bei Patienten mit HSA nach Splenektomie bei paralleler Verabreichung einer Peptid-basierten Impfung und einer MTD-Chemotherapie (Marconato et al., 2023). Ziel war es, mithilfe der Antigene der Tumorzellen eine spezifische Immunantwort auszulösen. Zur Herstellung der Vakzine wurden canine HSA-Zellen mit *Salmonella typhi* Ty21 infiziert. Das infizierte Sekretom wurde anschließend intradermal in der Nähe eines peripheren Lymphknotens injiziert. An der Impflokalisation wurde vorher topisch Imiquimod (Aldara® 5 % Creme, Meda Pharma) als zusätzliches Adjuvans aufgetragen. Es konnte eine tumorspezifische humorale Antwort und impfspezifische T-Zell-Antwort nachgewiesen werden. Zudem zeigte diese Gruppe eine bessere mediane ÜZ im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Vakzination (276 Tage vs. 175 Tage).

3. Dendritische Zelltherapie

Eine weitere Form der Immuntherapie ist die DCT, bei der sich die Eigenschaften der DC zunutze gemacht wird. Ziel ist es, mittels der Impfung von DC eine aktive spezifische Immunantwort gegen bestimmte Tumorzellen auszulösen und somit die sog. Immuntoleranz zu durchbrechen (Sadeghzadeh et al., 2020).

DC sind hochpotente antigenpräsentierende Zellen, die im Rahmen von Immunantworten gegen Pathogene, Tumorzellen und körpereigenen Zellen von großer Bedeutung sind. Sie befinden sich in initial unreifem Zustand hauptsächlich in der Haut und Schleimhaut. Nach Aufnahme von z. B. Tumorzellen mittels Phagozytose werden diese in kleine Peptidfragmente zerlegt, die sog. Tumorantigene. Bei der anschließenden Migration zu den lymphatischen Organen kommt es zur Reifung der DC und Präsentation der Antigene mittels dem Haupthistokompatibilitätskomplex-II-Molekül (MHC-II). Dies führt zur Aktivierung der T-Helferzellen (TH-Zellen), welche das CD4-Molekül tragen. In Folge kommt es zur Ausschüttung bestimmter Zytokine (u. a. Interferon- γ (IFN- γ) und IL-2), welche die Eliminierung der unerwünschten Zellen unterstützen (Gardner et al., 2020). Ein großer Vorteil der DC ist die Möglichkeit der Kreuzpräsentation. Bei diesem Vorgang sind die DC befähigt, extrazelluläre Antigene mittels MHC-I-Molekülen ebenfalls den zytotoxischen T-Zellen (Tc-Zelle) zu präsentieren, welche das CD8-Molekül tragen. Dies führt zur direkten Elimination der Zellen.

Am häufigsten werden die DC durch die Isolierung der Monozyten aus dem Blut des Patienten und anschließend durch die Zuführung bestimmter Zytokine gewonnen (meist IL-4 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor (GM-CSF)). Eine Alternative ist die Gewinnung der Zellen durch CD34+-hämatopoetische Zellen des peripheren Blutes, welche anschließend mithilfe bestimmter Wachstumsfaktoren vervielfacht werden (Schnurr et al., 2002). Meist werden die autologen DC mittels Tumorantigen/-lysate beladen, anschließend mithilfe eines Zytokin-Cocktails zur Reifung angeregt und zuletzt dem Patienten verimpft. Es gibt jedoch auch zahlreiche andere Methoden zur Herstellung der DCT (siehe auch Najafi und Mortezaee, 2023 für einen umfassenden Überblick)

3.1. Humanmedizin

In der Humanmedizin wird schon seit den 90er-Jahren der Einsatz der DCT erforscht, und es wurden verschiedene Methoden der Antigenbeladung untersucht. Am einfachsten und häufigsten ist die Beladung mit Tumorzell-Lysaten (Sadeghi Najafabadi et al., 2022). Weitere Optionen sind die Fusion von dendritischen Zellen mit Tumorzellen, RNA-Transfektion, DNA-Transfer oder die Beladung mit Neoantigenen (Bol et al., 2016; Nava et al., 2021). Bisher hat sich jedoch keine optimale Methode zur Einleitung einer verstärkten Immunantwort herauskristallisiert (Nava et al., 2021).

Insgesamt gibt es trotz intensiver Forschung nur wenige klinische Studien, die es bis zur Phase 3 geschafft haben. Hauptsächlich wurden verschiedene DCT bei Melanomen, Prostatakarzinomen, Gliomen und Nierenzellkarzinomen erforscht. Ein Review zahlreicher klinischer Studien durch Anguille et al. (2014) zeigte zwar eine antitumorale Immunantwort und nur milde bis keine Nebenwirkungen, allerdings erwies sich die bisherige klinische Wirksamkeit als begrenzt. Seit 2010 gibt es nur einen Impfstoff aus autologen DC, welcher in den USA von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen wurde: Bei dem Impfstoff Sipuleucel-T (Provenge®) werden autologe DC mit dem prostataspezifischen Protein saure Phosphatase (PA2024) fusioniert. In einer placebokontrollierten Doppel-Blind-Studie zeigte sich ein Überlebensvorteil von 4 Monaten bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom (Kantoff et al., 2010). Die Zulassung für die EU aus dem Jahr 2013 wurde 2015 aufgrund „nicht quantifizierbaren Zusatznutzen“ für die Patienten widerrufen und das Präparat vom Markt genommen. Auch in den USA wird die Therapie aufgrund fraglicher Effektivität und kritischer Betrachtung der

durchgeführten Studie selten eingesetzt (Sutherland et al., 2021).

Als Hauptproblematik für die bisher enttäuschende klinische Wirksamkeit der DCT wird das immunsuppressive Tumormikromilieu (TME) angesehen. Die Tumorzellen führen hierbei mithilfe von bestimmten Zellen (u. a. regulatorische T-Zellen (Treg), myeloide Suppressorzellen (MDSC)) zur Hemmung der Immunantwort und somit zur Progression des Tumors.

Aus diesem Grund wurde in einigen Studien die Hypothese aufgestellt, dass der kombinierte Einsatz der DCT mit anderen Therapieformen (Chemotherapie, Bestrahlungstherapie, Immuncheckpoint-Inhibitor (ICI)) zum Durchbruch der Immuntoleranz führen könnte (Najafi und Mortezaee, 2023; Nava et al., 2021). Ein Vorteil der Kombination wäre insbesondere bei Zytostatika und der Bestrahlungstherapie die Induktion eines immunogenen Zelltodes, welcher zusätzlich das Immunsystem aktiviert.

Zur Verbesserung der Wirksamkeit der DCT ist zudem vermehrt der Einsatz von im Blut vorkommenden DC in den Fokus geraten. Bisher wurden zur Vakzineherstellung in den meisten klinischen Studien v. a. Monozyten-abgeleitete DC (moDC) genutzt. Die Einteilung der DC im Blut erfolgt nach ihren Oberflächenmerkmalen (Cluster of Differentiation, CD). Dabei werden die myeloiden (konventionellen) DC (ausgehend von den myeloischen Vorläuferzellen; cDC) von den plazmazytoiden DC (ausgehend von den lymphatischen Vorläuferzellen, pDC) unterschieden. Die erste Gruppe kann weiter in 2 Subpopulationen (cDC-Typ 1, cDC-Typ 2) unterteilt werden. Diese beschriebenen Subtypen haben verschiedene Eigenschaften im Rahmen der Immunantwort. Weitere Studien zur Ermittlung der geeignetsten Subpopulation sind jedoch notwendig (Garg et al., 2017).

3.2. Tiermedizin

In der Tiermedizin gibt es im Vergleich zur Humanmedizin weitaus weniger klinische Studien zur DCT. Zudem wurde meist nur die Untersuchung einer kleinen Patientenzahl durchgeführt. Gyorffy et al. (2005) beschrieben den Einsatz einer DCT bei 3 Hunden mit malignem Melanom. Dabei wurden autologe DC aus dem Knochenmark herangezüchtet. In vitro erfolgte deren Transduktion mit einem adenoviralen Vektor, welcher zur Expressierung des humanen Melanom-Antigens gp100 befähigt ist. In der Studie zeigte ein Hund eine erhöhte Anzahl

antigenspezifischer Tc-Zellen und blieb 48 Monate nach Therapiebeginn rezidivfrei. Bei den beiden anderen konnten keine Tc-Zellen nachgewiesen werden und eine rasche Progression bzw. ein Rezidiv des Tumors waren ersichtlich. Vielversprechende Ergebnisse waren auch in einer anderen Studie zu beobachten, in der eine autologe DCT ohne vorheriges Priming mit einem Tumorantigen intratumoral verimpft wurde (Mito et al., 2010). Die DC wurden allerdings mit Schlitzschnecken-Hämocyanin (Keyhole limpet hemocyanin (KLH) aus der Hämolymphe der Großen Kalifornischen Schlüsselochschnecke (*Megathura crenulata*)) zur unspezifischen Immunstimulation inkubiert. Zusätzlich wurde IFN- γ intratumoral injiziert, welches antitumorale und immunmodulatorische Fähigkeiten besitzt. Insgesamt wurden 7 Patienten mit verschiedenen malignen und benignen Tumoren behandelt. 4 Patienten zeigten eine komplette, 2 eine partielle Remission. Eine weitere Studie beschreibt die Wirkung einer DCT nach Inkubation mit einem Toll-Like-Rezeptor-Liganden (TLR-Liganden) sowie der zusätzlichen Gabe von IFN- γ und einem Cyclooxygenase-2-Inhibitor (COX-2-I) (De Silva et al., 2017). Die DC wurden zudem mit Tumorlysat geprimt. In Maus-Modellen konnte eine deutliche Hemmung des Tumorwachstums sowie eine erhöhte antitumorale Aktivität beobachtet werden. Zudem wurden 4 Hunde mit verschiedenen malignen Tumoren behandelt. Bei 3 Hunden war klinisch ein Ansprechen ersichtlich. Diese zeigten im peripheren Blut einen deutlichen Anstieg von tumorspezifischen T-Zellen sowie eine Erniedrigung der MDSC und Treg-Zellen. Dennoch konnte bei einem Hund mit metastasiertem Nierenzellkarzinom trotz eines Anstiegs der T-Zellen eine Progression der Lungenmetastasen beobachtet werden.

Trotz der geringen Patientenzahl konnte in diesen Studien teilweise ein Ansprechen sowohl klinisch als auch laborchemisch nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse ermutigen zur weiteren Erforschung bzw. Entwicklung einer DCT.

3.2.1. PetBioCell

In Deutschland wird seit einigen Jahren eine DCT vermarktet, welche zur Behandlung von Tumorerkrankungen bei Hunden, Katzen und Pferden eingesetzt werden kann. Zur Herstellung der Vakzine wird dem Patienten 1 ml/kg venöses Vollblut entnommen. Aus dem peripheren Blut werden mittels Dichtegradientenzentrifugation die peripheren Blut-mononukleären Zellen (PBMC) isoliert. Durch Zusatz von caninem GM-CSF und IL-4 werden diese zu unreifen DC differenziert. Die Ernte der DC erfolgt nach einer Inkubation von 7

Tagen. Beim PetBioCell-Verfahren erfolgt kein Priming der DC mit Tumorantigenen. Die DC werden nach 9 Tagen im unreifen Zustand dem Patienten intradermal injiziert. Insgesamt erfolgt die Injektion 3 x im Abstand von einem Monat. Eine Fortführung der Behandlung alle 3 Monate wird empfohlen. Anhand der Therapie soll das Immunsystem bei der Abwehr der Tumorerkrankung unterstützt sowie die Immuntoleranz überwunden werden. In einem Kongressbeitrag, in dem 10 Hunde mit HSA diese DCT erhielten, wurde seitens der Herstellungsfirma über erstaunliche ÜZ berichtet (mediane ÜZ 458 Tage; Grammel, 2016). Dennoch gibt es bisher keine klinischen Studien nach den Grundsätzen der evidenzbasierten Medizin, die eine Wirksamkeit dieser Therapie belegen bzw. über ähnliche ÜZ berichten.

III. PUBLIKATION

Originalartikel

Thieme

Adjuvante Behandlung des caninen Hämangiosarkoms der Milz mit der autologen dendritischen Zelltherapie – eine prospektive, placebokontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie

Adjuvant treatment of canine splenic hemangiosarcoma with autologous dendritic cell therapy – a prospective, randomized double-blind study

Autorinnen/Autoren

Amalia Reck, Julia Gedon, Martin Kessler

Institut

Abteilung Onkologie, Tierklinik Hofheim, Hofheim

Schlüsselwörter

Immuntherapie, Tumor, Hund, Überlebenszeiten

Key words

Immunotherapy, tumor, dog, survival times

eingereicht 15.06.2023

akzeptiert 25.08.2023

Bibliografie

Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2023; 51: 394–402

DOI 10.1055/a-2197-9906

ISSN 1434-1239

© 2023, Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag, Rüdigerstraße 14,
70469 Stuttgart, Germany**Korrespondenzadresse**Amalia Reck
Katharina-Kemmler-Straße 7
65719 Hofheim
Deutschland
a.reck@tierklinik-hofheim.de**ZUSAMMENFASSUNG**

Gegenstand und Ziel Hämangiosarkome (HSA) der Milz beim Hund sind hochmaligne mesenchymale Tumoren, die eine hohe Metastasierungsneigung aufweisen. Auch mit adjuvanter Chemotherapie nach der Splenektomie liegen die medianen Überlebenszeiten i.d.R. bei lediglich 5–8 Monaten. Ziel dieser Studie war, anhand einer prospektiven randomisierten Doppelblindstudie nach der Splenektomie die Wirksamkeit einer adjuvanten dendritischen Zelltherapie nach der PetBioCell-Methode zu überprüfen. Zudem wurden mögliche unerwünschten Wirkungen dieser Therapie evaluiert.

Material und Methoden Einundzwanzig Hunde mit histologisch nachgewiesenem, nicht-metastasiertem HSA der Milz (Stadium I und II) nach Splenektomie wurden in die Studie inkludiert. Zehn Hunde erhielten die dendritische Zelltherapie, 11 Hunde bekamen ein Placebo injiziert. Die Applikation erfolgte nach Herstellerangaben in den ersten 3 Monaten monatlich, anschließend alle 3 Monate bis zum Tod der Patienten. Die Überlebenszeiten sowie die unerwünschten Wirkungen beider Gruppen wurden verglichen.

Ergebnisse Der Follow-up aller Patienten reichte bis zur Euthanasie oder Versterben aufgrund von Metastasen. Ein Patient aus der Gruppe mit der dendritischen Zelltherapie wurde aufgrund einer Prostatitis euthanasiert, dieser hatte die längste Überlebenszeit (668 Tage). Ein Hund aus der Placebo-Gruppe überlebte 448 Tage nach Splenektomie. Die mediane Überlebenszeit betrug bei der dendritischen Zelltherapie-Gruppe 74 Tage, bei der Placebo-Gruppe 126 Tage. Statistisch zeigte sich in der Tumor-freien Zeit ($t(18) = 1,4, p = 0,911$) und der Überlebenszeit ($t(19) = -0,094, p = 0,463$) zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied. Alle unerwünschten Wirkungen waren in der Therapiegruppe mild und selbstlimitierend, auch in der Placebo-Gruppe wurde von ähnlichen milden unerwünschten Wirkungen berichtet.

Schlussfolgerung und klinische Relevanz Die Immuntherapie mit autologen, unreifen und ungeprimten dendritischen Zellen nach der PetBioCell-Methode zeigte beim caninen Hämangiosarkom der Milz in dieser Studienpopulation keine nachweisbare Wirksamkeit hinsichtlich der Tumor-freien Zeit und Überlebenszeit.

ABSTRACT

Objective Canine splenic hemangiosarcomas (HSA) are malignant mesenchymal tumors with a high tendency for metastasis. Median survival times after splenectomy followed by adjuvant chemotherapy usually range between 5 and 8 months. The aim of this prospective randomized double-blind study was to examine the efficacy of a commercially available

ble dendritic cell therapy (PetBioCell) following splenectomy. In addition, possible side effects of this therapy were evaluated. **Material and methods** Twenty-one dogs with histologically confirmed splenic HSA without metastasis (stages I or II) were included in the study. Ten dogs received the dendritic cell therapy, and 11 dogs received a placebo. Injections were administered according to the manufacturer's instructions monthly for the first 3 months and then every 3 months until death. Survival times and toxicoses of both groups were compared.

Results Follow-up data were available for all 21 patients; the observation period ranging until euthanasia or metastasis-related death. One patient that had received the dendritic cell therapy was euthanized due to prostatitis and experienced the

longest survival time (668 days). One dog in the placebo-group lived for 448 days after splenectomy. The median survival times in the dendritic cell therapy and the placebo group amounted to 74 and 126 days, respectively. There was no significant difference in tumor-free interval ($t(18) = 1.4, p = 0.911$) and survival times ($t(19) = -0.094, p = 0.463$) between the 2 groups. Toxicoses reported in both groups were mild and self-limiting. **Conclusion** Immunotherapy using autologous, immature and unprimed dendritic cells according to the PetBioCell method failed to show efficacy on tumor-free interval and survival time in the presented dog population with splenic hemangiosarcoma.

Einleitung

Das Hämangiosarkom (HSA) ist ein maligner mesenchymaler Tumor, der beim Hund am häufigsten in der Milz vorkommt [1]. Betroffen sind vor allem große (median 26–29 kg) und ältere (median 10 Jahre) Hunde [2–4]. Das HSA der Milz neigt zur Ruptur mit akutem Hämoperitoneum [7, 8]. Es zeigt von allen Weichteilsarkomen des Hundes die höchste Metastasierungsneigung, wobei als Metastasierungsorte vor allem Lunge, Leber, Herz und Omentum beschrieben werden [5, 9–12]. Das HSA der Milz wird gemäß der WHO-Klassifizierung je nach Größe, Ruptur bei Vorstellung und Metastasierung in verschiedene Stadien eingeteilt [11, 16–18] (► Tab. 1).

Therapie der Wahl ist die Splenektomie. Aufgrund der hohen Metastasierungsneigung des Tumors liegen die medianen Überlebenszeiten bei alleiniger Splenektomie allerdings nur bei ca. 2–3 Monaten [8, 15–17], weshalb zur Lebensverlängerung eine adjuvante Therapie, meist mit anthracyclinhaltigen Protokollen, empfohlen wird [4, 11, 18]. Diese verlängern die medianen Überlebenszeiten auf ca. 5–8 Monaten [4, 11, 13, 16, 17, 19]. Aufgrund der nur geringen Überlebenszeitverlängerung einer alleinigen zytostatischen Adjuvanttherapie, wurden bereits früh auch adjuvante immuntherapeutische Behandlungsstrategien verfolgt. Die längsten bislang beschriebenen Überlebenszeiten von Hunden mit HSA der Milz wurden mit einer Kombination aus Chemotherapie (Doxorubicin/Cyclophosphamid) und Immuntherapie mit dem Makrophagenaktivator „Liposomales Muramyltripeptid Phosphatidylethanolamin“ (L-MTP-PE) erreicht [29]. Auch wenn andere immuntherapeutische Ansätze nur teilweise eine Wirksamkeit zeigten [15, 24, 25], wird dieser Therapiemodalität in der tiermedizinischen Onkologie grundsätzlich ein großes Potenzial zugesprochen [20].

In Deutschland wird seit einigen Jahren von der Firma PetBioCell eine autologe dendritische Zelltherapie für die Tumorbehandlung bei Tieren kommerziell angeboten. Dabei sollen aus dem eingesandten Blut des Patienten die Monozyten isoliert und mithilfe von Zytokinen dendritische Zellen (DCs) angezüchtet und anschließend intradermal injiziert werden [21]. In einem Kongressbeitrag berichtet PetBioCell bei 10 Hunden nach Splenektomie und adjuvanter Behandlung mit dendritischer Zelltherapie (DCT) von einer medianen Überlebenszeit von 458 Tagen [22], was die bisher in der Literatur beschriebenen Überlebenszeiten von Patienten mit adju-

vanter Chemotherapie deutlich übertrifft. Das PetBioCell-Verfahren kann laut Hersteller auch bei zahlreichen anderen Tumoren eingesetzt werden und wird dementsprechend intensiv beworben. Nach Wissen der Autoren wurden bislang jedoch keine Arbeiten in peer-reviewed Fachzeitschriften veröffentlicht, die die Wirksamkeit dieser Therapie bei Tumoren des Hundes oder der Katze wissenschaftlich belegen.

Primäres Ziel dieser klinischen Studie war es deshalb, anhand einer prospektiven, placebokontrollierten Doppelblindstudie die Wirksamkeit der DCT der Firma PetBioCell bei Hunden mit nicht-metastasiertem HSA der Milz zu überprüfen. Ein weiteres Ziel war es, eventuelle unerwünschten Wirkungen im Zusammenhang mit der DCT zu beschreiben und mit einer Kontrollgruppe zu vergleichen.

Material und Methoden

Patienten

In diese prospektive, placebokontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie wurden 21 Hunde aufgenommen, die im Zeitraum von Januar 2016 bis Juni 2021 aufgrund eines Milztumors mit einer Splenektomie behandelt wurden. Hiervon waren 13 in der Tierklinik Hofheim vorgestellt und operiert worden, bei den restlichen 8 war die Splenektomie in anderen Tierkliniken/-praxen durchgeführt und der Patient anschließend in der Tierklinik Hofheim zur Teilnahme an der Studie vorgestellt worden. Bei allen Hunden wurde ein HSA der Milz histopathologisch bestätigt. Alle Besitzer wurden über eine adjuvante Doxorubicin-Chemotherapie als den aktuellen Goldstandard der postoperativen Therapie aufgeklärt, hatten diese jedoch abgelehnt. Ausschlusskriterien waren bei der Operation bzw. zu Studienbeginn nachgewiesene makroskopische Metastasen (Stadium III), die Gabe einer Bluttransfusion vor der 1. Blutentnahme für die Gewinnung des Blutes zur Aufbereitung der DCs sowie das Vorhandensein bzw. ein Vorbericht anderer maligner Tumoren mit hoher Metastasierungsneigung.

Durchführung der Studie

Vor Beginn der Teilnahme an der Studie erfolgten Anamnese, klinische Untersuchung, Staging (Ultraschall Abdomen und Röntgen

► **Tab. 1** Klinische Stadieneinteilung für canine Hämangiosarkome [15].► **Table 1** Clinical staging system for canine hemangiosarcoma [15].

Primärtumor (T)	
T ₀	makroskopisch kein Tumor
T ₁	Tumor unter 5 cm Durchmesser und auf Milz beschränkt
T ₂	Tumor ≥ 5 cm oder rupturiert
T ₃	Tumor infiltriert umliegende Strukturen
Regionale Lymphknoten (N)	
N ₀	keine Lymphknotenmetastasen nachweisbar
N ₁	Metastase im regionalen Lymphknoten
N ₂	Metastasen in entfernten Lymphknoten
Fernmetastasen (M)	
M ₀	keine Fernmetastasen nachweisbar
M ₁	Fernmetastasen
Stadieneinteilung	
Stadium I	T ₀ oder T ₁ , N ₀ , M ₀
Stadium II	T ₁ oder T ₂ , N ₀ oder N ₁ , M ₀
Stadium III	T ₂ oder T ₃ , jedes N, M ₁

Thorax) und eine Blutuntersuchung (Hämatologie und klinische Chemie). Nach Einwilligung der Patientenbesitzer zur Teilnahme an der Studie wurde den Patienten 1 ml/kg venöses Vollblut in Citratröhrchen entnommen.

Die Herstellung der DCT erfolgte im Reinraumlabor der Firma PetBioCell. Die Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation (Dichtegradient Lymphoprep™ (1,077 g/ml, Stemcell)). Anschließend wurden die Monozyten aus den isolierten PBMC über die Adhärenz an Zellkulturschalen (TC-Schalen, Sarstedt™) in einem Zellkulturmedium (RPMI 1640, Merck Sigma Aldrich) gewonnen. Den Monozyten wurde zur Differenzierung zu unreifen DCs mit 5 µg/ml Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (canine GM-CSF, Bio-Techne, R&D Systems) und 5 µl/ml Interleukin-4 (recombinant canine IL-4 BioTechne, R&D Systems) [23, 24] supplementiert. Nach 7 Tagen Kultivierung (37 °C, 5% CO₂) wurden die unreifen DCs geerntet. Die Präsenz von DCs wurde durchflusszytometrisch unter der Verwendung von CD1b-Antikörpern (Bio-Rad AbD Serotec) kontrolliert. Je nach Charge war die Anzahl an DCs unterschiedlich. Zur Verabreichung akzeptabel werden im Verfahren der Firma mindestens 350000 lebende Zellen angesehen. Der Versand der Zellsuspension erfolgte gekühlt per Kurier. Am Tag 9 nach Probenentnahme erfolgte gemäß den Herstellerangaben die intradermale Injektion der DCT beim Patienten in die Inguinalregion.

Die Randomisierung und Verblindung der Patienten wurde vor Beginn der Studie von der Firma PetBioCell übernommen. Die Hälfte der Patienten erhielt nach dem Zufallsprinzip das Verum, die andere Hälfte (Placebo-Gruppe, PB-Gruppe) lediglich isotonsche 0,9%ige Kochsalzlösung. Beides wurde codiert, volumengleich und

gekühlt in identischer Verpackung (Einwegspritzen) an die Tierklinik mittels Expresskurier versandt. Gleichzeitig mit dem Versand der DCT erhielt die Klinik einen verschlossenen Umschlag mit der Angabe, welchem der beiden Behandlungsarme der jeweilige Patient angehörte. Zum Zwecke der Doppelverblindung verblieben alle Umschläge bis zum Ende der gesamten Studie ungeöffnet. Alle Untersuchungen sowie Injektionen erfolgten ambulant in der Tierklinik. Die Blutentnahme und anschließende DCT-Applikationen fanden gemäß den Therapieanweisungen des Herstellers in den ersten 3 Monaten monatlich, anschließend alle 3 Monate statt.

Nach jeder DCT-Applikation wurde zur Erfassung möglicher unerwünschter Wirkungen ein Fragebogen durch die Patientenbesitzer ausgefüllt. Der Fragebogen beinhaltete Fragen bezüglich des Leistungsstatus, der Körpertemperatur sowie des Auftretens von Juckreiz, Haarausfall und gastrointestinalen Symptomen innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Injektion. Anhand eines zweiten Fragebogens wurde der aktuelle Gesundheitszustand des Patienten (Lebensfreude, Aufmerksamkeitslevel, Dolenz, Appetit, Hygiene, Wasseraufnahme und Mobilität) bestimmt.

Die Durchführung der Studie wurde als klinische Studie beim zuständigen Regierungspräsidium (RP Darmstadt) angemeldet und genehmigt. Die Behandlungen im Rahmen dieser Studie erfolgten für die Tierbesitzer kostenfrei.

Verlaufsuntersuchungen

In den ersten 3 Monaten erfolgte monatlich eine klinische Untersuchung sowie ein abdominaler Ultraschall, anschließend erfolgten die Kontrollen 5, 8 und 11 Monate nach Beginn der Therapie. Bei allen Untersuchungen wurden Laborwerte erhoben (Hämatologie und klinische Chemie). Zusätzlich wurde 2, 5, 8 und 11 Monate nach Therapiebeginn ein Röntgen des Thorax durchgeführt. 3, 5 Monate nach Beginn der Therapie fand zusätzlich eine klinische Untersuchung und Ultraschallkontrolle des Abdomens statt (► **Tab. 2**). Die Kontrollen, Blutentnahmen und Vakzinationen erfolgten bis zur akuten Verschlechterung des Allgemeinbefindens oder Tod des Patienten. Nach dem Versterben aller Studienteilnehmer wurde die Studie durch eine neutrale Person entblindet.

Statistische Auswertung

Das primäre Ziel der Studie war der Vergleich der Überlebenszeiten beider Gruppen zur Überprüfung der Wirksamkeit der DCT beim nicht-metastasierten HSA der Milz beim Hund. Als klinische Outcomes wurden die mediane tumorfreie Zeit (TFZ) und die mediane Überlebenszeit (MÜZ) untersucht. TFZ wurde als Zeitraum von Beginn der DCT bis zum Auftreten von Metastasen anhand von Bildgebung definiert. Bei insgesamt 5 Patienten ($n_{PB}=2$, $n_{DC}=3$) wurde aufgrund des akuten Versterbens ohne zuvor nachweisbare Metastasierung die TFZ als Zeit von Beginn der Therapie bis zum Versterben des Patienten angesehen. Ein Patient in der DC-Gruppe verstarb nicht Tumor-assoziiert und zeigte keine Metastasierung zum Todeszeitpunkt, weshalb dieser bei Berechnung der TFZ zensuriert wurde. Diese Variabel wurde folglich bei 11 Patienten in der PB-Gruppe und 9 Patienten in der DC-Gruppe berechnet. Die MÜZ wurde als Zeitraum vom Therapiebeginn bis zum Versterben der jeweiligen Studienteilnehmer definiert. Zur grafischen Darstellung wurden die Kaplan-Meier-Kurven verwendet. Der Vergleich von TFZ bzw. MÜZ beider Gruppen erfolgte mittels t-Test für unabhän-

► **Tab. 2** Studiendesign.

► **Table 2** Study design.

Monat	0	1	2	3,5	5	8	11
Blutentnahme für Herstellung der Vakzine *	x	x	x		x	x	x
Ultraschall Abdomen	x	x	x	x	x	x	x
Röntgen Thorax	x		x		x	x	x
Blutbild/Blutchemie	x	x	x		x	x	x

* Vakzination 9 Tage später

► **Tab. 3** Studienteilnehmer.

► **Table 3** Study population.

		PB-Gruppe	DC-Gruppe
Alter (Jahr)	Median (Bereich)	10 (5–13)	10 (7–13)
Gewicht	Median (Bereich)	25,4 (8,5–30)	31,2 (18–45)
Rasse	Mischling	5	4
	Appenzeller Sennenhund		1
	Australian Shepherd		2
	Rhodesian Ridgeback	1	
	Beagle	2	
	Flat Coated Retriever		1
	Labrador Retriever	1	1
	Malinois	1	
	Eurasier	1	
	Englische Bulldogge		1
Stadium			
	I	1	1
	II	10	9

gige Stichproben sowie Log-rank-Test. Eine statistische Relevanz wurde ab einem P-Wert < 0,05 angenommen. Die statistischen Analysen wurden mit der Software jamovi durchgeführt [25].

Ergebnisse

Im Zeitraum von 2016 bis 2021 wurden insgesamt 21 Patienten in die Studie aufgenommen, bei denen die Einschlusskriterien erfüllt waren (histologisch bestätigtes HSA der Milz, keine Bluttransfusion vor Blutentnahme zur Herstellung der DCT, keine makroskopisch erkennbaren Metastasen zum Zeitpunkt der Operation, keine relevanten anderen bösartigen Tumoren). Insgesamt 10 Patienten hatten die DCT und 11 das Placebo (PB) erhalten. Alter, Rasse und Gewichtsklasse waren in beiden Gruppen vergleichbar (► **Tab. 3**).

Placebo-Gruppe (PB-Gruppe)

Die PB-Gruppe bestand aus insgesamt 11 Tieren (weiblich n = 7, davon 4 kastriert; n = 4 männlich, davon 2 kastriert). Häufigster Vorstellungsgrund war ein reduziertes Allgemeinbefinden (n = 10, davon 6 akut). Weiterhin fielen den Besitzern Inappetenz (n = 4), ein umfangsvermehrtes Abdomen (n = 2), Gewichtsverlust (n = 2), abdominale Dolenz, vermehrtes Hecheln, Vomitus, Durchfall und Fieber (je n = 1) auf. In 2 Fällen war der Milztumor ein Zufallsbefund. Klinisch zeigten sich vor allem Anzeichen einer akuten Kreislaufinsuffizienz (blasse Schleimhäute (n = 6), Tachykardie (n = 2), schwacher Puls (n = 1), Hypothermie (n = 2) bzw. hypovolämischer Schock (n = 2)) und eines akuten Abdominalgeschehens (umfangsvermehrtes (n = 6) und dolentes Abdomen (n = 4)). Ein Patient wies eine Hyperthermie auf. Bei einem Patienten sind die Befunde der klinischen Untersuchung vor Splenektomie nicht bekannt. Bei 6 Patienten erfolgte die Splenektomie in der Tierklinik Hofheim. Die restlichen 5 waren andernorts operiert worden. 10 Hunde waren gemäß der WHO-Stadieneinteilung im Stadium II, ein Patient im Stadium I. Vom Tag der Splenektomie bis zum Beginn der Verabreichung des Placebos lagen im Mittel 20,6 Tage (Bereich 9–29 Tage). Ein Großteil der Patienten (n = 4) erhielt 3 Injektionen. Je 2 Hunde erhielten 2 bzw. 4 Behandlungen. 1, 5 bzw. 6 Placebo-Applikationen erfolgten bei je einem Hund.

Als unerwünschte Wirkungen wurden in der PB-Gruppe von den Besitzern eine leichte Rötung (n = 3) und Juckreiz (n = 2) an der Injektionsstelle, vermehrtes Schmatzen (n = 2), Hypersalivation (n = 2), vermehrtes Hecheln (n = 2), Unruhe (n = 1) und Hyperthermie (39,9 °C nach 24 Stunden, n = 1) beschrieben.

Verum-Gruppe (DC-Gruppe)

Die DC-Gruppe bestand aus 8 männlichen (n = 7 kastriert) und 2 kastrierten weiblichen Hunden. Vorstellungsgründe waren reduziertes Allgemeinbefinden (n = 10, davon 4 akut), ein dolentes Abdomen (n = 2) sowie Inappetenz (n = 2). Seltener fielen Vomitus, ein umfangsvermehrtes Abdomen, Zittern oder vermehrtes Hecheln auf (je n = 1). Die klinische Untersuchung war vergleichbar mit den Befunden in der PB-Gruppe (blasse Schleimhäute (n = 6), Tachykardie (n = 4), reduziertes Allgemeinbefinden, umfangsvermehrtes und dolentes Abdomen (je n = 2), Fieber sowie schwacher Puls (je n = 1)). In 4 Fällen waren die Befunde der klinischen Untersuchung nicht bekannt. Sechs Patienten aus der Gruppe wurden in der Tierklinik Hofheim operiert. Bei den anderen 4 Patienten erfolgte die

Splenektomie in anderen Tierkliniken/-praxen. Gemäß der WHO-Stadieneinteilung waren alle Patienten bis auf einen im Stadium II, der Patient mit Stadium I hatte keine Milztumorruptur zum Zeitpunkt der Splenektomie. Die 1. Behandlung erfolgte im Mittel 22 Tage nach der Operation (Bereich 18–27 Tage). In dieser Gruppe erhielten 4 Patienten 2 DCT-Applikationen. Die Anzahl an Injektionen bei den restlichen Patienten ist vergleichbar mit der PB-Gruppe (3 und 4 Behandlungen je $n=2$, 1 und 6 Injektion(en) je $n=1$).

Als unerwünschte Wirkungen nach der Behandlung traten eine leichte Rötung ($n=4$) und Juckreiz ($n=1$) an der Injektionsstelle, geringgradig reduziertes Allgemeinbefinden ($n=3$), vermehrtes Hecheln ($n=2$), Hyperthermie ($39,4^{\circ}\text{C}$ nach 12 Stunden), Vomitus sowie Inappetenz am Tag der Vakzination (je $n=1$) auf.

Klinisches Outcome

Eine Sektion zum Todeszeitpunkt mit histopathologischem Nachweis einer Metastasierung erfolgte bei keinem der Patienten. Bei 20 Patienten legten die Befunde zum Todeszeitpunkt jedoch einen Zusammenhang mit dem Tumor nahe. Bei 8 Patienten aus der PB-Gruppe lagen sonografische Hinweise auf Metastasen in Leber ($n=4$), Omentum ($n=3$) und retroperitoneal ($n=2$) vor. Die 3 übrigen Patienten der PB-Gruppe wurden ohne eingehende Diagnostik euthanasiert, 2 aufgrund von hochgradigem Hämaskos bzw. Aszites sowie hochgradiger Anämie, ein dritter verstarb nach akutem Kollaps. Bei allen 3 wurde eine intraabdominale Blutung aufgrund einer rupturierten Metastase vermutet.

Vergleichbar zur PB-Gruppe fielen bei 7 Patienten aus der DC-Gruppe sonografische Hinweise auf Metastasen in Leber ($n=4$), Peritoneum ($n=2$), retroperitoneal, Omentum sowie subkutan im Narbenbereich (je $n=1$) auf. Bei einem Patienten mit Verdacht auf Netzmetastasen lagen in der Röntgenuntersuchung des Thorax außerdem Hinweise auf Lungenmetastasen vor. Zudem wurde dieser Patient 1 Monat zuvor aufgrund eines Perikardergusses vorgestellt. Zwei Patienten aus dieser Gruppe wurden ohne eingehende Diagnostik aufgrund einer hochgradigen Anämie ($n=2$) und Hämaskos ($n=1$) euthanasiert. Bei beiden wurde eine intraabdominale Blutung nach Ruptur einer Metastase als Ursache vermutet. Ein Patient aus der DC-Gruppe wurde nach 686 Tagen aufgrund eines Verdachts auf Prostatitis mit akuter Verschlechterung des Allgemeinbefindens euthanasiert. Zu diesem Zeitpunkt wies die Bildgebung (Ultraschall Abdomen und Röntgen Thorax) keine Hinweise auf Metastasen auf. Dieser Patient hatte von allen Studienteilnehmern die längste Überlebenszeit.

Die mediane TFZ war in der PB-Gruppe (103 Tage) höher als in der DC-Gruppe (47 Tage), was sich jedoch statistisch als nicht signifikant erwies ($t(18)=1,4$, $p=0,911$). Aufgrund des Langzeitüberlebenden in der PB-Gruppe (TFZ: 363 Tage) war der Test auf die Normalverteilung für den t-Test nicht erfüllt. Nach Ausschluss des Studienteilnehmers waren die Voraussetzungen erfüllt, statistisch zeigte sich jedoch weiterhin kein signifikanter Unterschied ($t(17)=1,03$, $p=0,840$).

Die MÜZ betrug bei der PB-Gruppe 126 Tage, bei der DC-Gruppe 74 Tage. Der Unterschied in der MÜZ war statistisch nicht bedeutsam ($t(19)=-0,094$, $p=0,463$). Der Test auf die Normalverteilung war für den t-Test ebenfalls aufgrund der beiden Langzeitüberlebenden (448 Tage in der PB-Gruppe, 668 Tage in der DC-Gruppe) nicht erfüllt. Die Anwendung dieses Verfahrens nach Ausschluss der beiden Ausreißer zeigte weiterhin keinen statistischen Unter-

schied ($t(17)=0,669$, $p=0,744$). Grafisch wurde die mediane TFZ und MÜZ jeweils mit der Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (► **Abb. 1**). Der Log-Rank-Test zeigte statistisch keinen bedeutsamen Unterschied der medianen TFZ und MÜZ zwischen den beiden Gruppen ($\chi^2\text{TFZ}(1)=2,0$, $p=0,154$ und $\chi^2\text{MÜZ}(1)=0,009$, $p=0,936$).

Nur je ein Patient aus jeder Gruppe war zum Diagnosezeitpunkt im Stadium I. Hiervon hatte der Patient aus der PB-Gruppe in seiner Gruppe die längste Überlebenszeit (448 Tage), während der Patient im Stadium I aus der DC-Gruppe nur 47 Tage überlebte.

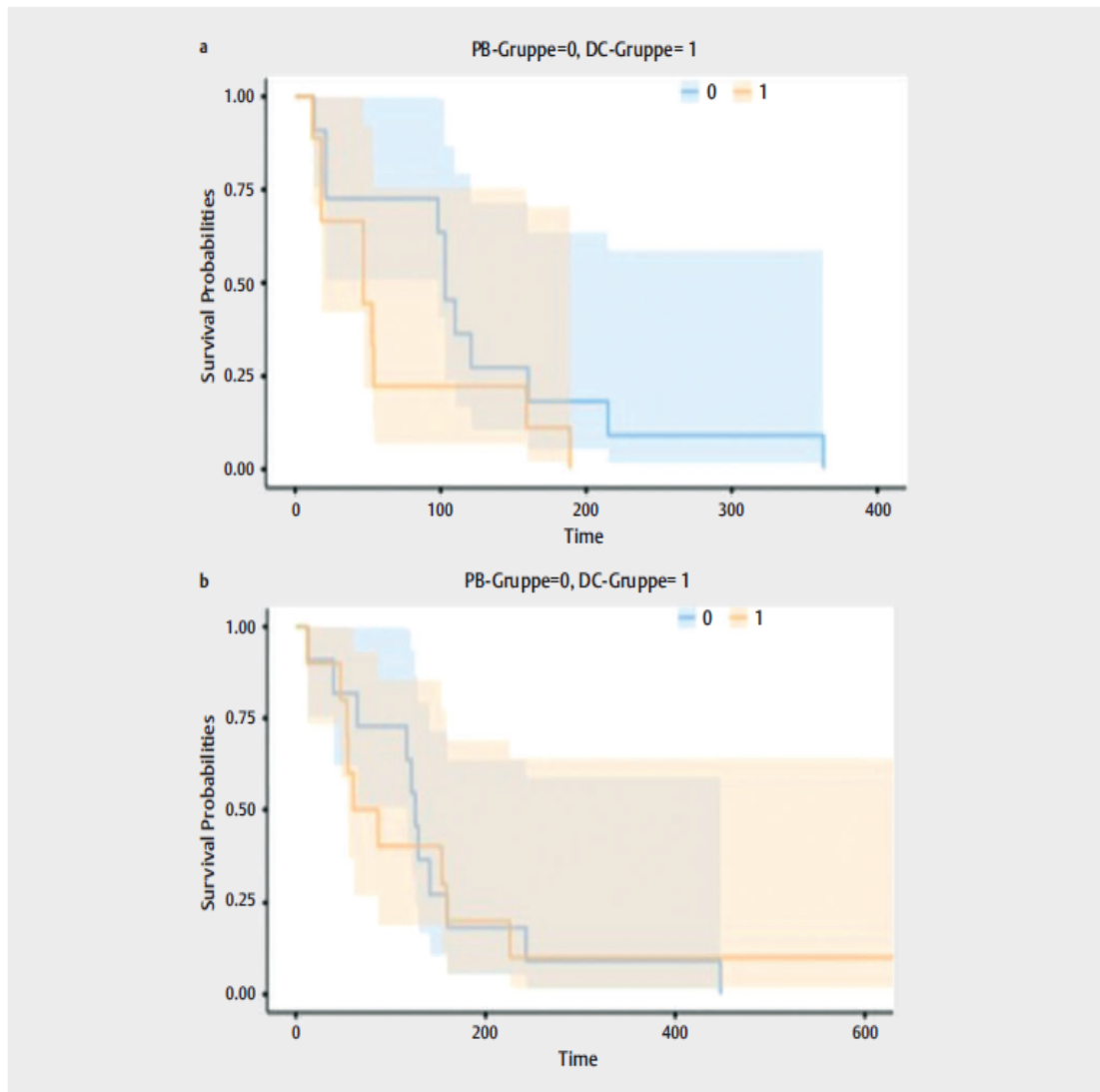
Diskussion

Das HSA der Milz stellt das Weichteilsarkom des Hundes mit der höchsten Metastasierungsrate dar. Fast alle Patienten versterben nach Splenektomie innerhalb weniger Monate aufgrund von Metastasen [4, 8, 18]. Zahlreiche Studien zeigen bei Anwendung einer adjuvanten Chemotherapie eine Verbesserung der Überlebenszeiten um lediglich wenige Monate [4, 11, 16, 17, 19]. Die Häufigkeit und Prognose dieser Erkrankung führt zur intensiven Suche nach neuen Therapieoptionen. Hierbei werden zur Überprüfung einer Wirksamkeit prospektive, placebokontrollierte Blindstudien als „Goldstandard“ angesehen.

Die Rasse- und Altersverteilung der Patienten der vorliegenden Studie entsprechen den in der Literatur beschriebenen Risikogruppen [6, 9, 10]. Die Verteilung der Patienten auf die beiden Therapiearme erfolgte zufällig, erwies sich aber bis auf das Geschlechterverhältnis als weitgehend vergleichbar. Da es aus der Literatur keine Hinweise auf eine geschlechtsabhängige Prognose der Patienten gibt, wurde diese ungleiche Verteilung bei der Auswertung als nicht relevant erachtet. Aufgrund der überschaubaren Fallzahl dieser Studie wurden zur besseren Vergleichbarkeit Patienten mit möglichst gleichen Erkrankungsstadien (Stadium I oder II) gewählt. Im Gegensatz zu anderen Studien [4, 16] fanden Wood et al. [8] und Gardner et al. [14] keinen signifikanten Unterschied der Überlebenszeiten zwischen Patienten im Stadium I und II [8, 14]. In einigen Untersuchungen [26–28] war allerdings das Vorliegen von Makrometastasen zum Diagnosezeitpunkt (Stadium III) prognostisch relevant, weshalb nach dem Studiendesign Hunde mit diesem Stadium aus der Studie exkludiert wurden. Ein differenzierender Vergleich zwischen den Stadien I und II in unserer Studie war aufgrund geringer Fallzahlen nicht möglich.

Tumoren exprimieren nicht selten veränderte Oberflächen-Antigene, was die Grundlage der antineoplastischen Immuntherapie bildet. Bereits Mitte der 90er Jahre wiesen Vail et al. [29] darauf hin, dass eine Immuntherapie beim HSA der Milz zu einer Verbesserung der Überlebenszeiten führen könnte. In ihrer Studie zeigten sich bei Anwendung des Makrophagenaktivators L-MTP-PE zusätzlich zu einer Chemotherapie signifikant verlängerte Überlebenszeiten [29]. In einer weiteren Studie wurden 13 Hunden zusätzlich zur Gabe von Doxorubicin mit einer Immuntherapie bestehend aus einem allogenen Tumorzell-Impfstoff aus Lysaten zweier caniner HSA-Zelllinien intraperitoneal behandelt. Hierbei zeigten sich allerdings keine besseren Überlebenszeiten im Vergleich zu den ausschließlich mit Chemotherapie behandelten 15 Patienten [30].

Zur Gruppe der Ganzzellimpfstoffe gehören die autologen, vom Patienten abgeleiteten Immunzellimpfstoffe, u. a. auch die auf der Basis autologer DCs entwickelten Impfstoffe [38]. Die Aufgabe der DCs ist die Aufnahme und der Transport der Antigene zu den drai-



► **Abb. 1** Kaplan-Meier-Kurve mit Ansicht der medianen tumorfreien Zeit (TFZ; a) sowie der medianen Überlebenszeit (MÜZ; b) der Placebo-Gruppe (PB-Gruppe, blaue Linie) und der Verum-Gruppe (DC-Gruppe, orange Linie). Die farblichen Schattierungen heben das 95 % Konfidenzintervall hervor. Quelle: A. Reck.

► **Fig. 1** Kaplan-Meier-curve showing the median tumor-free interval (TFI, a) and the median survival time (MST, b) of the placebo group (PB group, blue line) and the verum group (DC group, orange line). The colored shading highlights the 95 % confidence interval. Source: A. Reck.

nierenden Lymphknoten, um sie dort zytotoxischen T-Lymphozyten zu präsentieren. Dieser Vorgang ist sowohl bei der Abwehr von Infektionserregern, als auch im Rahmen der T-Zell-abhängigen Anti-Tumor-Immunität von Bedeutung [31]. In der Humanmedizin wurde der Einsatz der DCT bei bestimmten Tumorarten eingehend erforscht [32–34], Phase-III-Studien wurden bisher aber nur bei einigen Tumorentitäten, zum Beispiel Prostatakarzinomen erreicht [35]. In der Tiermedizin wurden bisher nur sehr vereinzelt Therapieansätze mit DC verfolgt. Konduri et al. [36] verabreichten 5 Hunden mit HSA der Milz eine intraperitoneale Therapie mit autologen DCs. Diese wurden vorher in vitro mit Tumor-mRNA beladen, welche aus einem Lysat des Tumorgewebes gewonnen wurde. Parallel erfolgte eine Therapie mit Alpha-Interferon und Doxorubicin in submaximaler

Dosis (20 mg/m²). Die mediane Überlebenszeit der Patienten lag bei 109 Tagen und war nicht besser als bei konventionell therapierten Patienten. Ausnahme war ein Hund, welcher 16 Monate tumorfrei blieb, weshalb dieser Therapie in der Diskussion ein Wirkungspotential zugesprochen wurde [36]. Die von PetBioCell entwickelte Immuntherapie basiert ebenfalls auf der Transplantation autologer DCs, allerdings kommen bei diesem Verfahren naive (unreife und nicht mit Tumorantigen beladene) DCs zum Einsatz. Die vom Hersteller in einem Kongressbeitrag [22] berichteten deutlich längeren Überlebenszeiten im Vergleich zur bislang bekannten Literatur können in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

Mit einer Überlebenszeit von über 2 Jahren lebte ein Patient in der DC-Gruppe ungewöhnlich lang. Auch in der Literatur werden

bei knapp 10% der Patienten lange Überlebenszeiten nach alleiniger Splenektomie beschrieben [8]. In der Untersuchung von Wendelburg et al. [17] zeigte sich so eine 1-Jahres-Überlebensrate von 11,1%, 4 von 145 Hunden überlebten > 2 Jahre ohne adjuvante Therapie. Auch in der PB-Gruppe erreichte ein Patient eine Überlebenszeit von > 1 Jahr. Die Gründe für dieses Phänomen sind unklar, doch unterstreicht es die Bedeutung einer Placebogruppe bei der Wirksamkeitsüberprüfung einer Therapie.

Eine mögliche Erklärung für die Unwirksamkeit des PetBioCell-Verfahrens könnte auf die Applikation von unreifen und nicht mit Tumorantigenen beladenen DCs zurückzuführen sein. Für die Wirksamkeit einer DCT ist die Reifung der verimpften DCs relevant. Diese geschieht nach Kontakt mit Zytokinen, die durch inflammatorische und neoplastische Prozesse freigesetzt werden. In der Humanmedizin werden therapeutisch eingesetzte DCs vor der Verimpfung zumeist in vitro mit einem Zytokincocktail zur Reifung stimuliert. Einige Studien ermittelten einen Vorteil bei der Vakzination reifer gegenüber unreifer DCs [37, 38]. Reife DCs haben bessere migratorische Fähigkeiten sowie eine höhere Expression von Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC). Letztere sind für die Antigenpräsentation und -erkennung durch T-Zellen wichtig. Zudem besteht die Hypothese, dass unreife DCs eine Antigen-spezifische Toleranz des Immunsystems bewirken können [33]. Da in unserer Studie die autologe Zelltransplantation 2–3 Wochen nach Splenektomie sowie vor Auftreten von Makrometastasen erfolgte, könnten die notwendigen Zytokine zur Reifung der Zellen gefehlt haben. Beim Menschen wird eine DCT üblicherweise zudem mit Tumorlysat-/Tumorantigen-beladenen DCs durchgeführt [33]. Dies wird als ein wichtiger Schritt zur Stimulation der DC und zur Überwindung des immunsuppressiven Tumormikromilieus angesehen. Auch unter diesen Aspekten ist die postulierte Wirksamkeit der von Petbiozell entwickelten Immuntherapie prinzipiell kritisch zu hinterfragen.

Trotz aller Forschung gab es für den Menschen bislang nur ein einziges zugelassenes Medikament (Sipuleucel-T®), bestehend aus reifen DCs beladen mit dem prostataspezifischen Protein „saure Phosphatase“ (PA2024) als Tumorantigen. Die Vakzine war bis 2015 zur Therapie fortgeschrittener Prostatakarzinome des Menschen zugelassen, das Präparat wurde jedoch aufgrund nicht quantifizierbarem Zusatznutzen vom Markt genommen.

Verschiedene Reviews der humanmedizinischen Literatur [32–34, 39] beschäftigen sich mit dem bislang fehlenden klinischen Nutzen der DC-Impfstoffstrategien. Kritisiert wurden vor allem fehlende standardisierte Verfahren. Die Faktoren (geeignete Tumorantigene und Zytokine, Menge der verimpften DC und die Applikationsart), welche potenziell zu einer Optimierung der Therapie führen könnten, konnten selbst nach jahrelanger Forschung nicht ermittelt werden. Als weiterer Grund wird der Zerfall vieler DC nach der Injektion vermutet. Nur < 5% der Zellen erreichen die regionalen Lymphknoten [40]. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die notwendige Überwindung des Immun-Escape Mechanismus des Tumors durch die autologen DCs. Die genannten Aspekte weisen darauf hin, dass neue Techniken entwickelt werden müssen, um das Potenzial dendritischer Zellen effektiver nutzen zu können. Als möglicher Ansatz wird beispielsweise die Verbesserung der Antigen-Beladung- und Präsentation durch die DCs mit Hilfe von Nanopartikeln, Antikörper-Antigen-Konjugaten oder Virus-Co-Delivery-Systemen diskutiert [39].

Vergleichbar mit der Erfahrung beim Menschen erwies sich in dieser Studie die DCT als nebenwirkungsarm. Die unerwünschten Wirkungen waren mild, selbstlimitierend und teilweise nur als „subjektive“ Veränderung wahrnehmbar. Interessanterweise traten in beiden Gruppen die Nebenwirkungen in gleicher Anzahl und Ausprägungsgrad auf, wobei ein direkter Zusammenhang mit der Behandlung teilweise nur vermutet bzw. aus der zeitlichen Assoziation mit der Behandlung rückgeschlossen werden konnte.

Eine Limitierung der Studie ist insbesondere die geringe Patientenzahl. Eine Power-Analyse erfolgte vor Beginn der Studie nicht und somit könnte die Patientenzahl zu gering gewesen sein, um einen signifikanten Überlebensunterschied darzustellen. Allerdings zeigten die Ergebnisse nicht einmal ansatzweise verbesserte Überlebenszeiten der DC-Gruppe, weshalb die Wahrscheinlichkeit für einen statistisch signifikanten Effekt der PetBioCell Therapie selbst bei einer deutlichen Ausweitung der Probandenzahl als gering einzustufen gewesen wäre. Eine weitere Limitierung ist das Fehlen einer neutralen wissenschaftlich-analytischen Verifizierung bezüglich der Anzahl injizierter lebender DCs. Die Verifizierung der Anzahl und Viabilität der DC erfolgte vor dem Versand des Impfstoffs im Labor der Herstellerfirma. Auch wenn Transport und Geschwindigkeit der Applikation stets gemäß den Vorgaben des Herstellers erfolgten, wurde nicht erneut unabhängig geprüft, wie viele lebensfähige Zellen beim individuellen Patienten zur Anwendung kamen.

FAZIT FÜR DIE PRAXIS

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Applikation extrakorporal expandierter, unreifer dendritischer Zellen nach der Methode der Firma PetBioCell zu keiner nachweisbaren Verbesserung der Überlebenszeit bei Hunden mit HSA der Milz führt. Vor dem Hintergrund gleichartiger Ergebnisse humanmedizinischer Studien sollte die Wirksamkeit des PetBioCell-Verfahrens bereits vom Grundprinzip her diskutiert werden. Von einer einzelnen placebokontrollierten Studie kann jedoch nicht auf eine grundsätzliche Unwirksamkeit einer Therapiestrategie geschlossen werden. Aus diesem Grund sind weitere Studien, auch im Rahmen anderer Tumorerkrankungen sowie eine Weiterentwicklung der Immuntherapie von großer Bedeutung.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

Anmerkung

Die Ergebnisse wurden als Poster mit dem Titel „Adjuvant treatment of canine hemangiosarcoma of the spleen with dendritic cell therapy according to the Petbiozell method“ auf dem Kongress der European Society of Veterinary Oncology in Alicante vom 25.–27.5.2023 vorgestellt.

Literatur

- [1] Eberle N, von Babo V, Nolte I et al. Splenic masses in dogs. Part I: Epidemiologic, clinical characteristics as well as histopathologic diagnosis in 249 cases (2000-2011). *Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2012; 40: 250-260
- [2] Moore AS, Rassnick KM, Frimberger AE. Evaluation of clinical and histologic factors associated with survival time in dogs with stage II splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy and adjuvant chemotherapy: 30 cases (2011-2014). *J Am Vet Med Assoc* 2017; 251: 559-565. DOI: 10.2460/javma.251.5.559
- [3] Kessler M, Maurus Y, Koestlin R. Das Hämangiosarkom der Milz – Klinische Aspekte bei 52 Hunden. *Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 1997; 25: 651-656
- [4] Batschinski K, Nobre A, Vargas-Mendez E et al. Canine visceral hemangiosarcoma treated with surgery alone or surgery and doxorubicin: 37 cases (2005-2014). *Can Vet J* 2018; 59: 967
- [5] Mullin C, Clifford CA. Histiocytic Sarcoma and Hemangiosarcoma Update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2019; 49: 855-879. DOI: 10.1016/j.cvsm.2019.04.009
- [6] Prymak C, McKee LJ, Goldschmidt MH et al. Epidemiologic, clinical, pathologic, and prognostic characteristics of splenic hemangiosarcoma and splenic hematoma in dogs: 217 cases (1985). *J Am Vet Med Assoc* 1988; 193: 706-712
- [7] Hammond TN, Pesillo-Crosby SA. Prevalence of hemangiosarcoma in anemic dogs with a splenic mass and hemoperitoneum requiring a transfusion: 71 cases (2003-2005). *Sci Rep* 2008; 232: 6
- [8] Wood C, Moore A, Gliatto J et al. Prognosis for dogs with stage I or II splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy alone: 32 cases (1991-1993). *J Am Anim Hosp Assoc* 1998; 34: 417-421. DOI: 10.5326/15473317-34-5-417
- [9] Griffin MA, Culp WTN, Rebhun RB. Canine and feline haemangiosarcoma. *Vet Rec* 2021; 189: e585. DOI: 10.1002/vetr.585
- [10] Brown NO, Patnaik AK, MacEwen EG. Canine hemangiosarcoma: retrospective analysis of 104 cases. *J Am Vet Med Assoc* 1985; 186: 56-58
- [11] Ogilvie GK, Powers BE, Mallinckrodt CH et al. Surgery and doxorubicin in dogs with hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med* 1996; 10: 379-384. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1996.tb02085.x
- [12] Alvarez FJ, Hosoya K, Lara-Garcia A et al. VAC Protocol for Treatment of Dogs with Stage III Hemangiosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 2013; 49: 370-377. DOI: 10.5326/JAAMA-MS-5954
- [13] Sorenmo K, Samluk M, Clifford C et al. Clinical and pharmacokinetic characteristics of intracavitary administration of pegylated liposomal encapsulated Doxorubicin in dogs with splenic hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1347-1354
- [14] Gardner HL, London CA, Portela RA et al. Maintenance therapy with toceranib following doxorubicin-based chemotherapy for canine splenic hemangiosarcoma. *BMC Vet Res* 2015; 11: 131. DOI: 10.1186/s12917-015-0446-1
- [15] Mullin C, Clifford CA. Miscellaneous tumors: Hemangiosarcoma. In: *Withrow SJ, Vail DM, Page RL. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. Elsevier Health Sciences; 2019: 773-778*
- [16] Kim SE, Liptak JM, Gall TT et al. Epirubicin in the adjuvant treatment of splenic hemangiosarcoma in dogs: 59 cases (1997-2004). *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231: 1550-1557. DOI: 10.2460/javma.231.10.1550
- [17] Wendelburg KM, Price LL, Burgess KE et al. Survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy with or without adjuvant chemotherapy: 208 cases (2001-2012). *J Am Vet Med Assoc* 2015; 247: 393-403. DOI: 10.2460/javma.247.4.393
- [18] Clifford CA, Mackin AJ, Henry CJ. Treatment of canine Hemangiosarcoma: 2000 and Beyond. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 479-485. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2000.tb02262.x
- [19] Sorenmo KU, Baez JL, Clifford CA et al. Efficacy and toxicity of a dose-intensified doxorubicin protocol in canine hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 209-213. DOI: 10.1892/0891-6640(2004)18<209:eatoad>2.0.co;2
- [20] Bergman PJ. Cancer Immunotherapies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2019; 49: 881-902. DOI: 10.1016/j.cvsm.2019.04.010
- [21] PetBioCell 'Dendritische Zelltherapie'. Im Internet: <https://www.petbiocell.de/dendritische-zelltherapie> Stand: 02.05.2023
- [22] Dr. Thomas Grammel. A pilot, uncontrolled study of postsurgical treatment with autologous dendritic cell-based immunologic therapy in 10 dogs with splenic hemangiosarcoma. *3rd World Vet Conf Foz Iguacu, Brazil May 25-29 2015* 2016.
- [23] Romani N, Gruner S, Brang D et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93. DOI: 10.1084/jem.180.1.83
- [24] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179: 1109-1118. DOI: 10.1084/jem.179.4.1109
- [25] The jamovi project (2023). jamovi (Version 2.3) Windows 11. Retrieved from <https://www.jamovi.org>
- [26] Matsuyama A, Poirier VJ, Mantovani F et al. Adjuvant Doxorubicin with or without Metronomic Cyclophosphamide for Canine Splenic Hemangiosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 2017; 53: 304-312. DOI: 10.5326/JAAMA-MS-6540
- [27] Masyr AR, Rendahl AK, Winter AL et al. Retrospective evaluation of thrombocytopenia and tumor stage as prognostic indicators in dogs with splenic hemangiosarcoma. *J Am Vet Med Assoc* 2021; 258: 630-637. DOI: 10.2460/javma.258.6.630
- [28] Bray JP, Orbell G, Cave N et al. Does thalidomide prolong survival in dogs with splenic haemangiosarcoma? *J Small Anim Pract* 2018; 59: 85-91. DOI: 10.1111/jsap.12796
- [29] Vail D, Macewen E, Kurzman I et al. Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine adjuvant immunotherapy for splenic hemangiosarcoma in the dog: a randomized multi-institutional clinical trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 1995
- [30] U'Ren LW, Biller BJ, Elmslie RE et al. Evaluation of a novel tumor vaccine in dogs with hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 113-120. DOI: 10.1892/0891-6640(2007)21[113:eoantv]2.0.co;2
- [31] Broz ML, Binnewies M, Boldajipour B et al. Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell* 2014; 26: 638-652. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.09.007
- [32] Gardner A, de Mingo Pulido Á, Ruffell B. Dendritic cells and their role in immunotherapy. *Front Immunol* 2020; 11: 924. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00924
- [33] Bol KF, Schreibelt G, Gerritsen WR et al. Dendritic Cell-Based Immunotherapy: State of the Art and Beyond. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 1897-1906. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1399
- [34] Nava S, Lisini D, Frigerio S et al. Dendritic cells and cancer immunotherapy: The adjuvant effect. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 12339. DOI: 10.3390/ijms222212339
- [35] Anguille S, Smits EL, Lion E et al. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol* 2014; 15: e257-e267. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70585-0

- [36] Konduri V, Halpert MM, Baig YC et al. Dendritic cell vaccination plus low-dose doxorubicin for the treatment of spontaneous canine hemangiosarcoma. *Cancer Gene Ther* 2019; 26: 282–291. DOI: 10.1038/s41417-019-0080-3
- [37] Lee AW, Truong T, Bickham K et al. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 2002; 20: A8–A22. DOI: 10.1016/s0264-410x(02)00382-1
- [38] Draube A, Klein-González N, Mattheus S et al. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6: e18801. DOI: 10.1371/journal.pone.0018801
- [39] Sutherland SIM, Ju X, Horvath LG et al. Moving on from Sipuleucel-T: New dendritic cell vaccine strategies for prostate cancer. *Front Immunol* 2021; 12: 641307. DOI: 10.3389/fimmu.2021.641307
- [40] De Vries IJM, Krooshoop DJEB, Scharenborg NM et al. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* 2003; 63: 12–17



IV. DISKUSSION

HSA der Milz bei Hunden sind hochmaligne Tumoren. Viele Patienten werden bereits perioperativ euthanasiert oder versterben bei alleiniger Splenektomie nach nur wenigen Monaten aufgrund von Metastasen (Batschinski et al., 2018; Clifford et al., 2000; Wood et al., 1998). Therapie der Wahl bei einem HSA der Milz ist daher die Splenektomie, gefolgt von einer adjuvanten Chemotherapie mit einem anthracyclinhaltigen Protokoll oder einer MC mit CTX. Allerdings verbessern adjuvante Therapien die ÜZ nur um wenige Monate (Batschinski et al., 2018; Bray et al., 2018; Kim et al., 2007; Ogilvie et al., 1996; Wendelburg et al., 2015). Immuntherapeutische Therapieansätze beim caninen HSA der Milz zeigten in der Vergangenheit vielversprechende Ergebnisse, weshalb seit Jahren v. a. auch nach neuen wirksamen immuntherapeutischen Optionen geforscht wird.

Immuntherapie für Hämangiosarkome in der Tiermedizin

Mitte der 90er-Jahre erbrachte die Anwendung einer aktiven unspezifischen Immuntherapie bei Patienten mit HSA der Milz vielversprechende Ergebnisse (Vail et al., 1995). In dieser Studie zeigte die zusätzliche Anwendung des Makrophagenaktivators L-MTP-PE zur Chemotherapie (DOX, CTX) die längsten bisher beschriebenen medianen ÜZ (277 Tage). U'Ren et al. (2007) untersuchte bei 13 Hunden eine aktive spezifische Immuntherapie bestehend aus einem allogenen Tumorigenimpfstoff aus Lysaten zweier caniner HSA-Zelllinien. Die Applikation erfolgte intraperitoneal, zusätzlich erfolgte ebenfalls eine Chemotherapie mit DOX. Zwar zeigten weiterführende Untersuchungen das Hervorrufen einer humoralen Immunantwort, doch waren die medianen ÜZ ähnlich im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche nur mit DOX behandelt wurde. Grundsätzlich wird jedoch der adjuvanten Immuntherapie beim caninen HSA ein therapeutisches Potenzial bescheinigt (Musser et al., 2022).

DC-basierte antineoplastische Immuntherapie

Die auf Basis autologer DC entwickelten Anti-Tumor Impfstoffe gehören zur Gruppe der aktiven spezifischen Immuntherapie. DCs sind wichtige antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems. Durch ihre Fähigkeit zur Kreuzpräsentation führen sie nach Aufnahme eines Antigens und anschließender Wanderung in den drainierenden Lymphknoten zur Aktivierung sowohl der Tc-

Zellen sowie der TH-Zellen. Darüber hinaus reduzieren sie Immunrepressoren, wie z.B. CD4+CD25+Foxp3+ Treg-Zellen (Schmidt et al., 2004). Dies sind wichtige Vorgänge im Rahmen der T-Zell-abhängigen Anti-Tumor-Immunität (Broz et al., 2014). In-vitro- und In-vivo-Studien konnten zeigen, dass die Vakzination von mit Tumor-Lysaten geprimten DCs therapeutische Anti-Tumor-Aktivität entfalten können (Lim et al., 2007). In der Humanmedizin wird der Einsatz der DCT bei bestimmten Tumorarten seit Jahren eingehend erforscht (Bol et al., 2016; Gardner et al., 2020; Nava et al., 2021). In allen Studien war eine Immunantwort nachweisbar, allerdings war der klinische Nutzen meist gering. Phase-III-Studien konnten bisher nur bei Prostatakarzinomen, Melanomen, Glioblastomen und Nierenzellkarzinomen erreicht werden (Anguille et al., 2014).

In der Tiermedizin wurden bisher nur sehr vereinzelt Therapieansätze mit DC verfolgt. Gründe hierfür sind v. a. die Kosten und die aufwändige Logistik randomisierter klinischer Studien. Ein weiterer Aspekt ist aber auch der Mangel an bekannten Oberflächenantigenen bei bestimmten Tumoren (Klingemann, 2021). Konduri et al. (2019) führten eine Phase-I-Pilotstudie durch, in der 5 Hunde mit HSA der Milz eine intraperitoneale Therapie mit autologen DC erhielten. Die DC wurden vorher in vitro mit Tumor-mRNA beladen, welches aus einem Lysat des resezierten Tumorgewebes gewonnen wurde. Zusätzlich erfolgte eine Therapie mit IFN- α und DOX in submaximaler Dosis (20 mg/m²). Ein Hund blieb tumorfrei für 16 Monate, weshalb dieser Therapieform ein Wirkungspotential zugesprochen wurde. Allerdings betrug die mediane ÜZ der Patienten insgesamt nur 109 Tage.

Eine von der Firma PetBioCell entwickelte Immuntherapie basiert ebenfalls auf der Anwendung autologer DC. Hierbei werden die DC aus dem peripheren Blut herangezüchtet und anschließend in unreifem Zustand dem Patienten injiziert. Eine vorherige Beladung mittels Tumorantigenen findet nicht statt. In einem Kongressbeitrag berichtet die Firma von 10 Hunden mit HSA der Milz, die mit dieser Therapie behandelt wurden und überdurchschnittlich lange ÜZ zeigten (Grammel, 2016).

Ziel dieser placebokontrollierten Doppel-Blind-Studie war die Evaluierung des von der Firma PetBioCell kommerziell vertriebenen, auf ungeprimten, unreifen autologen dendritischen Zellen basierenden Immuntherapieverfahrens hinsichtlich Wirksamkeit und möglicher Nebenwirkungen bei Hämangiosarkompatienten.

Material und Methoden

Prinzipiell sollten neue Therapieverfahren in wissenschaftlich kontrollierten Studien untersucht und erst nach ausreichenden Hinweisen auf eine Wirksamkeit zur breiten Anwendung empfohlen werden. Hierbei werden prospektive, placebokontrollierte Blind-Studien als der „Goldstandard“ angesehen. Bei diesem Studiendesign wird eine randomisierte Gruppe von Patienten mit dem zu testenden Therapieverfahren behandelt (Verum-Gruppe) und mit einer ähnlich zusammengesetzten Kontrollgruppe gleichartiger erkrankter und überwachter Patienten verglichen, die jedoch ein wirkungsloses Placebo enthält (Placebo-Gruppe; PB-Gruppe). Die „Verblindung“ bedeutet, dass weder der Arzt noch die Patientenbesitzer Informationen erhält, welchem der beiden Therapiearmen der jeweilige Patient zugehört. Die Entblindung und Auswertung erfolgen erst nach Beendigung der gesamten Studie, um eine vollständige Neutralität zu wahren.

Patientenbesitzer, die eine adjuvante Chemotherapie nach einer Operation ablehnten, wurde die Teilnahme an der Studie angeboten. Gründe für die Ablehnung der Chemotherapie waren meist die Sorge vor Nebenwirkungen, damit assoziierte Kosten und/oder die trotz Adjuvanttherapie enttäuschende Prognose (ÜZ in der Regel < 1 Jahr).

Zur Vereinheitlichung des Patientenguts und somit zur besseren Vergleichbarkeit der DC- und PB-Gruppe wurden vor Beginn der Studie verschiedene Ausschlusskriterien festgelegt. Patienten in den Erkrankungsstadien I und II wurden zugelassen, da einige Studien keine signifikanten Unterschiede in der Prognose zwischen Patienten im Stadium I und II gezeigt hatten (Gardner et al., 2015; Wood et al., 1998). Hingegen wurden Patienten mit zum Zeitpunkt der Splenektomie makroskopisch erkennbaren Metastasen (Stadium III) von der Studie ausgeschlossen, da diese im Vergleich zu Patienten ohne Makrometastasen in vielen Untersuchungen eine deutlich schlechtere ÜZ zeigen (Masyr et al., 2021; Matsuyama et al., 2017). In beiden Gruppen gehörte die Mehrheit der Patienten dem Stadium II (rupturierter Tumor) an, lediglich je ein Patient war im Stadium I. Dies beruht darauf, dass erkrankte Hunde häufig erst im Rahmen eines Schockgeschehens nach Ruptur des Milztumors vorstellig werden. Milzveränderungen führen in der Regel nur zu unspezifischen Symptomen oder sind symptomlos, weshalb sie bis zur Ruptur meist unbemerkt bleiben. Ein Vergleich zwischen den beiden Stadien war in dieser Studie aufgrund der nur

geringen Fallzahlen nicht möglich.

Weitere Ausschlusskriterien waren andere höher maligne Neoplasien zum Zeitpunkt der Hämangiosarkomdiagnose (u. a. Osteosarkom, malignes orales Melanom, Mammakarzinom) sowie eine vorherige Chemotherapiegabe. Ein weiteres Ausschlusskriterium war die Gabe einer Bluttransfusion z. B. im Rahmen der Splenektomie nach Tumorrupturn, da diese die Herstellung der autologen DCT beeinflussen könnte.

In der vorliegenden Studie war die Rasse- und Altersverteilung der Patienten vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen klassischen Risikogruppen (Brown et al., 1985; Griffin et al., 2021; Prymak et al., 1988). Die Verteilung der Patienten auf beide Therapiearme (PB und DC) erfolgte randomisiert und bereits vor Beginn der Studie. Insgesamt erwies sich das Signalement in beiden Therapiearmen bis auf das Geschlechtsverhältnis als weitestgehend vergleichbar. Die Literatur berichtet von keiner geschlechtsabhängigen Prognose bei Patienten mit HSA der Milz, weshalb dies bei der Auswertung als für die Fragestellung nicht relevant erachtet wurde.

Ergebnisse

Die Mehrheit der Patienten in beiden Gruppen verstarb aufgrund von Metastasen des HSA. Leider erfolgte bei keinem der verstorbenen Patienten eine Sektion mit histopathologischer Untersuchung. Ein Patient in der DC-Gruppe verstarb aufgrund einer anderen Grunderkrankung und zeigte in der Bildgebung keine Hinweise auf Metastasen. Dieser zeigte von allen Studienteilnehmer die längste ÜZ. Die medianen ÜZ in beiden Therapiearmen sind mit den beschriebenen ÜZ nach alleiniger Splenektomie vergleichbar (Batschinski et al., 2018; Wood et al., 1998).

In unserem Patientengut zeigte sich bei dem Vergleich beider Gruppen (PB- und DC-Gruppe) kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der medianen ÜZ. Somit war beim caninen HSA nach Anwendung der Kriterien einer evidenzbasierten Medizin keine Wirksamkeit des PetBioCell Therapieverfahrens nachvollziehbar.

Langzeitüberlebende

In jeder der beiden Therapiegruppen gab es interessanterweise je einen langzeitüberlebenden Patienten (ÜZ > 1 Jahr). Der langzeitüberlebende Patient der

DC-Gruppe überlebte 2 Jahre und verstarb letztendlich nicht aufgrund der Tumorerkrankung. Derjenige der PB-Gruppe zeigte eine ÜZ von über einem Jahr und verstarb vermutlich aufgrund der Ruptur von Lebermetastasen. Beim HSA der Milz wird in der Literatur bei etwa 10 % der Patienten nach alleiniger Splenektomie von ÜZ von > 1 Jahr berichtet (Wood et al., 1998). So lag in der Studie von Wendelburg et al. (2015) die 1-Jahr-Überlebensrate nach alleiniger Splenektomie bei 11,1 %, 4 von 145 Hunden (4,2 %) überlebten sogar > 2 Jahre ohne zusätzliche systemische Therapie. Die Gründe für diese ungewöhnlich langen ÜZ sind unklar, aber ihr Vorkommen unterstreicht die Wichtigkeit einer PB-Gruppe und kann nicht als Hinweis auf die Wirksamkeit einer Therapie gewertet werden.

Mögliche Gründe für eine Unwirksamkeit des PetBioCell -Verfahrens

Die PetBioCell-Methode postuliert eine verbesserte Immunreaktion gegen die Tumorerkrankung durch die zusätzliche Applikation unreifer und nicht antigen-geprimter „naiver“ DCs (vgl. <https://www.petbiocell.de>). Dies impliziert die Annahme, dass Tumorpatienten entweder einen Mangel an DCs aufweisen und daher von einer Wiederherstellung eines physiologischen Pools an DC profitieren könnten oder dass eine „Übersupplementation“ unreifer DCs eine verstärkte Immunantwort induzieren würde.

Als ein möglicher Grund für die Unwirksamkeit der Therapie wird die Anwendung von unreifen DC angesehen. Nur der Kontakt mit bestimmten Zytokinen, die bei inflammatorischen oder neoplastischen Prozessen ausgeschüttet werden, führt zur Reifung der DC. Da in unserer Studie die Therapie 2-3 Wochen nach der Milzexstirpation und vor Auftreten von Makrometastasen verabreicht wurde, könnten die notwendigen Zytokine zur Reifung der Zellen gefehlt haben. Insgesamt ermittelten einige Studien einen Vorteil der Vakzination reifer gegenüber unreifer DCs (Draube et al., 2011; Lee et al., 2002). Zum einen haben reife DC bessere migratorische Fähigkeiten sowie eine höhere Expression von MHC-I und -II, die für die Antigenpräsentation und -erkennung durch T-Zellen von großer Bedeutung sind. Zum anderen könnten unreife DC eine Antigen-spezifische Toleranz des Immunsystems hervorrufen (Bol et al., 2016). In der Humanmedizin wird aus diesem Grund häufig bereits in vitro die Reifung durch bestimmte Zytokincocktails stimuliert.

Zudem ist es fraglich, wie viele der verimpften DCs überhaupt zu den peripheren

Lymphknoten wandern. Aufgrund des Zerfalls vieler DC direkt nach der Injektion gibt es Hinweise, dass selbst bei Verimpfung reifer DCs grundsätzlich nur < 5 % der Zellen die regionalen Lymphknoten erreichen (De Vries et al., 2003).

Eine wichtige mögliche Erklärung für die Ergebnisse unserer Studie ist das Fehlen einer in-vitro-Beladung der DC mit spezifischen Tumorantigenen oder multiplen Tumorantigenen z. B. durch Inkubation mit Tumorlysat. Alle in der humanmedizinischen Forschung verwendeten Strategien der DCT verwenden antigenbeladene DCs (Bol et al., 2016). In der Studie von Gyorffy et al. (2005) wurden 3 Hunde mit malignem Melanom mit einer autologen DCT behandelt. Nur bei einem Hund konnte eine antigen-spezifische zytotoxische T-Zell-Aktivität nachgewiesen werden, und dieser zeigte als einziger Patient über einen langen Zeitraum (48 Monate) keine Hinweise auf ein Rezidiv oder Metastasen. In der genannten Studie (Gyorffy et al., 2005) wurden die autologen DC jedoch mit einem adenoviralen Vektor transduziert, welcher das humane Melanom-Antigen gp100 exprimiert, so dass eine tumorspezifische immuntherapeutische Wirkung möglich war. Im Vergleich hierzu werden bei der Methode von PetBioCell naive DC verimpft, womit sie für eine antitumorale Wirksamkeit auf einen „zufälligen“ Kontakt mit HSA-Tumorantigenen angewiesen wären. Ob es zu einer Aktivität der verimpften DCs kam, wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht, da keine Untersuchung der zytotoxischen T-Zell-Aktivität im Blut der Patienten erfolgte.

Unter den genannten Aspekten muss die postulierte Wirksamkeit der PetBioCell Immuntherapie mit unreifen und naiven DC vom Grundprinzip her kritisch hinterfragt werden. Neue immuntherapeutische Ansätze in der Tumorthherapie haben großes Potential auch in der Tiermedizin, doch sollte vor der Vermarktung eines Verfahrens eine ausreichende Forschung zum proof-of-principle eines Therapieansatzes gefolgt von klinischen Studien nach den Grundsätzen der evidenzbasierten Medizin stehen (Makker et al., 2024).

Dendritische Zelltherapie in der Humanmedizin

Trotz aller Forschung sind die derzeitigen Ergebnisse verschiedener klinischer Studien bei der autologen DCT beim Menschen ebenfalls enttäuschend (Nava et al., 2021). Bislang gibt es mit Sipuleucel-T (Provenge®) nur einen einzigen, zugelassenen Impfstoff auf Basis autologer DC. Bei dieser DC-Tumorvaccine werden reife DC mit dem prostataspezifischen Protein „saure Phosphatase“

(PA2024) als Tumorantigen beladen. Bis 2015 war dieses Präparat in der EU zur Behandlung fortgeschrittener Prostatakarzinome beim Menschen zugelassen. Aufgrund von Zweifeln bezüglich der Ergebnisse der klinischen Studien, den hohen Kosten und dem fraglichen Zusatznutzen der Therapie wurde das Präparat letztendlich jedoch wieder vom Markt genommen.

Viele verschiedene Reviews (Bol et al., 2016; Gardner et al., 2020; Jung et al., 2018; Nava et al., 2021; Sutherland et al., 2021) gehen den möglichen Gründen für die fehlende Effektivität der bisher angewandten DCT nach. Hierzu zählen u. a. mangelnde Immunogenität vieler Tumoren und ein immunsuppressives Tumormilieu (tumor microenvironment, TME). Als ein großer Faktor wird auch das Fehlen standardisierter Applikationsverfahren genannt. Welche Applikationsroute (intradermal, intranodal, intravenös, intraperitoneal), welche Menge an DC und wie häufig sowie in welchen Intervallen die Gabe erfolgen sollte, um die höchste Effektivität zu erreichen, bleibt auch nach jahrelanger Forschung unklar.

Zudem konnte bisher nicht ermittelt werden, welches Verfahren zur Tumorantigenbeladung das Geeignetste ist. Am einfachsten und häufigsten wird Tumorlysat verwendet. Nachteil dieser Methodik ist, dass hierbei auch körpereigene Antigene präsentiert werden könnten und dadurch die Entstehung einer Autoimmunerkrankung gefördert werden könnte. In vielen Studien waren jedoch kaum Nebenwirkungen ersichtlich. Neuere Verfahren wie die Anwendung von Neoantigenen, Antikörper-Antigen-Konjugaten oder Virus-Co-Delivery-Systemen zur Verbesserung der Antigenbeladung und -präsentation werden derzeit diskutiert (Garg et al., 2017; Sutherland et al., 2021).

Seit Jahren ist bekannt, dass die Anwendung von reifen DC zur besseren Wirksamkeit der Therapie zu empfehlen ist (Bol et al., 2016). Meist wird zur Induktion der Zellreifung ein Zytokincocktail verwendet. Jedoch können bestimmte Zytokine (u.a. Prostaglandin-E2 (PGE2)) das immunsuppressive TME durch z. B. die Aktivierung von Treg-Zellen unterstützen. Aus diesem Grund wird derzeit nach neueren Methoden (z. B. TLR- oder CD40-Liganden) gesucht. Das optimale Verfahren zur Reifung der DC wird derzeit jedoch noch erforscht (Anguille et al., 2014).

Weiterhin ist in den letzten Jahren der Einsatz von verschiedenen Subpopulationen

der DC in den Fokus geraten. In der Regel erfolgt die Herstellung der moDC aus dem peripheren Blut *in vitro* durch Inkubation mit zwei Zytokinen (GM-CSF und IL-4). Die moDC haben jedoch nach der lange benötigten *in vitro*-Kultivierung nur noch eine eingeschränkte Funktionalität. Es ist derzeit unklar, ob die Anwendung anderer Subpopulationen (cDC1, cDC2, pDC) effektiver eine Anti-Tumor-Immunität hervorrufen könnte. Dennoch könnte die Anwendung einer DCT, welche mehrere Subpopulationen beinhaltet, von Vorteil sein (Lee et al., 2023).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der als eine Hauptursache für die Ineffektivität der DCT angesehen wird, ist die Notwendigkeit der Überwindung des immunsuppressiven TME (Jung et al., 2018). Durch verschiedene Mechanismen kommt es u. a. zur Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen, Downregulation der MHC-Expression sowie Beeinträchtigung der Antigenpräsentation (Nava et al., 2021). Mittels der Entwicklung neuerer Generationen und der Optimierung des Herstellungsverfahrens der DCT wird versucht, dieses zu überwinden.

Viele Studien favorisieren die Gabe der DCT im adjuvanten Setting (Bol et al., 2016; Indelicato und Finkelstein, 2012; Najafi und Mortezaee, 2023; Nava et al., 2021). Die Kombination einer DCT mit Chemo- oder Strahlentherapie oder mit kleinmolekularen Wirkstoffen (z. B. Checkpointinhibitoren (ICI)) werden in der Literatur diskutiert (van Gulijk et al., 2018). Eine vorherige Behandlung mit Chemotherapie führt zum Tod der Tumorzellen, deren Fragmente anschließend immunogen wirken können. So ist bekannt, dass untergehende Tumorzellen über ein hohes immunogenes Potential verfügen und die Anti-Tumor-Immunität von Immuntherapeutika verstärken können (Garg et al., 2017). In einigen Studien konnte auch ein synergistischer Effekt bei Patienten beobachtet werden, welche vor der DCT eine Bestrahlungstherapie erhielten (Nava et al., 2021).

In den letzten Jahren hat eine neuere Immuntherapie (ICI) an Bedeutung gewonnen. ICI sind Antikörper, die durch die Hemmung bestimmter Oberflächenproteine (u. a. Programmed cell death protein 1 (PD-1)) die Anti-Tumor-Immunität unterstützen. Allerdings kommt es bei dieser Therapieform häufig zu Resistenzen. Bei einem Vergleich mehrerer Studien, welche ICI in Kombination mit einer DCT verabreichten, konnte eine suffiziente und auch langfristige Anti-Tumor-Aktivität beobachtet werden (Najafi und Mortazaei, 2023).

Nebenwirkungen

Über milde Nebenwirkungen wurde bei beiden Therapiegruppen unserer Studie berichtet, ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen in Art, Häufigkeit und Intensität der Nebenwirkungen lag jedoch nicht vor. Interessant ist die Tatsache, dass Besitzer auch bei der PB-Gruppe, die lediglich zellfreies Kulturmedium injiziert bekam, über Nebenwirkungen berichteten. Bei beiden Gruppen waren die beobachteten Symptome meist subjektiv, und ein direkter Zusammenhang mit der Behandlung konnte teilweise nur vermutet werden. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer PB-Gruppe bei der Evaluation nicht nur der Wirksamkeit, sondern auch der Nebenwirkungen eines Therapieverfahrens. Allerdings ist anzumerken, dass das Zellkulturmedium selbst möglicherweise immunogene Komponenten enthalten könnte, die zu einer lokalen Reaktion oder systemischen fiebrigen Entzündung Anlass geben könnten.

Einschränkungen der Studie

Eine wichtige Limitierung ist die geringe Patientenzahl. Eine Poweranalyse erfolgte vor Studienbeginn nicht. Da sich jedoch bei den Patienten aus der DC-Gruppe nicht einmal ein Trend zu besseren ÜZ im Vergleich zur PB-Gruppe zeigte, wird es als unwahrscheinlich erachtet, dass eine höhere Probandenzahl andere Ergebnisse erbracht hätten. Ein weiterer Punkt ist bei den verstorbenen Patienten das Fehlen einer Sektion und ggf. histopathologischen Untersuchung. Zum Todeszeitpunkt wurden bei 3 Patienten aus der PB-Gruppe und 2 aus der DC-Gruppe keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt, somit konnte nur anhand der Symptome die Tumorerkrankung als Todesursache vermutet werden. Bei dem Patienten mit der längsten ÜZ aus der DC-Gruppe fanden sich zum Todeszeitpunkt anhand bildgebender Untersuchungen keine Hinweise auf eine Metastasierung. Auch in diesem Fall hätte eine Sektion mit histopathologischer Untersuchung sicherere Ergebnisse erbracht.

Zur weiteren Beurteilung der Wirkung dieses Therapieverfahrens wäre die Untersuchung der zytotoxischen T-Zell-Aktivität aus dem peripheren Blut von Interesse gewesen. In vielen Studien aus der Humanmedizin zeigte sich zwar keine klinische Verbesserung der ÜZ, doch konnte eine erhöhte T-Zell Aktivität als Folge der DCT nachgewiesen werden, womit der Therapie zumindest eine anti-tumorale Immunantwort zugesprochen werden konnte (Nava et al., 2021).

Eine weitere wichtige Limitierung ist das Fehlen einer neutralen wissenschaftlich-analytischen Verifizierung der DCs vor der Vakzination. Vor Versand erfolgte zwar eine Untersuchung der Anzahl und Viabilität der DC im Labor der Herstellerfirma, und der Transport und die Applikation der DCT erfolgten gemäß den Vorgaben des Herstellers, jedoch wurde nicht unabhängig überprüft, in welcher Anzahl lebende DC schließlich dem jeweiligen Patienten verabreicht wurden.

Schlussfolgerung

Anhand der Ergebnisse dieser Studie konnte bei der Applikation autologer, unreifer DC nach der PetBioCell-Methode keine Wirksamkeit bei Hunden mit HSA der Milz nachgewiesen werden. Zwar kann durch eine einzelne placebokontrollierte Studie nicht auf eine grundsätzliche Unwirksamkeit des PetBioCell-Verfahrens geschlossen werden, doch sollte auf dem Hintergrund der Ergebnisse humanmedizinischer Studien und im Hinblick auf die Verwendung unreifer und nicht mit Tumorantigenen beladener DCs das Wirkungspotential der PetBioCell-Methodik vom Grundprinzip her kritisch hinterfragt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Zielsetzung

HSA der Milz beim Hund sind hochmaligne mesenchymale Tumoren. Aufgrund ihrer hohen Metastasierungsneigung, liegen die medianen ÜZ nach Splenektomie und adjuvanter Chemotherapie bei 5-8 Monaten.

Ziel dieser prospektiven placebokontrollierten Doppel-Blind-Studie war es, die Wirksamkeit einer adjuvanten DC nach der PetBioCell-Methode nach erfolgter Milzexstirpation zu evaluieren. Mögliche Nebenwirkungen dieser Therapie wurden überprüft.

Material und Methoden

In dieser Studie wurden insgesamt 21 Hunde mit histologisch nachgewiesenem HSA der Milz nach Splenektomie inkludiert. Ausschlusskriterien waren das Vorliegen von Metastasen oder weiterer hochmaligner Tumore, die Durchführung einer Chemotherapie und der Erhalt einer Bluttransfusion intra- oder postoperativ. 10 Hunde erhielten die DC, 11 Hunde bekamen ein PB verabreicht. Die Injektionen erfolgten intradermal in den ersten 3 Monaten monatlich, anschließend alle 3 Monate bis zum Tod der Patienten. Die Überlebenszeiten sowie Nebenwirkungen beider Gruppen wurden verglichen.

Ergebnisse

Die Nachverfolgung aller Patienten erfolgte bis zur Euthanasie bzw. bis zum Versterben aufgrund von Metastasen. Ein Patient aus der DC-Gruppe wurde aufgrund einer anderen Erkrankung euthanasiert, dieser hatte die längste Überlebenszeit (668 Tage). Aus der PB-Gruppe überlebte ein Hund 448 Tage nach Splenektomie, dieser verstarb aufgrund von Metastasen. Die mediane Überlebenszeit betrug bei der DC-Gruppe 74 Tage, bei der PB-Gruppe 126 Tage.

Insgesamt zeigte sich statistisch kein signifikanter Unterschied in der ÜZ zwischen den beiden Gruppen ($t(19) = -0,094$, $p = 0,463$). In beiden Gruppen wurden ähnliche milde und selbstlimitierende Nebenwirkungen beobachtet.

Schlussfolgerung und klinische Relevanz

Die Anwendung von autologen, unreifen und ungeprimten DC nach der PetBioCell-

Methodik zeigte beim HSA der Milz des Hundes keine nachweisbare Wirksamkeit.

VI. SUMMARY

Objective

Splenic HSA of the dog are malignant mesenchymal tumours. Due to their high tendency to metastasis, the median survival times after splenectomy and adjuvant chemotherapy range between 5 to 8 months.

The goal of this prospective placebo-controlled double-blinded study was to assess the effectiveness of the dendritic cell therapy according to the PetBioCell-method after splenectomy. Possible side effects of this therapy were also evaluated.

Material and methods

In this study 21 dogs with histologically confirmed splenic HSA were included. Exclusion criteria were the presence of metastasis or another malignant tumour, receiving a chemotherapy or blood transfusion intra- or postoperatively. 10 dogs obtained the dendritic cell therapy, 11 dogs received a placebo. Injections were administered intradermally monthly for the first 3 months and then every 3 months until death. Survival times and side effects of both groups were compared.

Results

For all 21 patient's follow-up data were available until euthanasia or metastasis-related death. One patient of the DC-group was euthanized due to another disease and had the longest survival time (668 days). One dog in the PB-group lived for 448 days, he died due to metastasis.

The median survival times in the DC- and PB-group were 74 and 126 days, respectively. There was no significant difference in survival times between the two groups ($t(19) = -0.094$, $p = 0.463$). Side effects in both groups were mild and self-limiting.

Conclusion

The application of autologous, immature, and unprimed dendritic cells according to the PetBioCell-method showed no efficacy in canine splenic hemangiosarcoma.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Alexander, C.K., Cronin, K.L., Silver, M., Gardner, H.L., London, C., 2019. The addition of metronomic chemotherapy does not improve outcome for canine splenic haemangiosarcoma. *J. Small Anim. Pract.* 60, 32–37. <https://doi.org/10.1111/jsap.12926>
- Alvarez, F.J., Hosoya, K., Lara-Garcia, A., Kisseberth, W., Couto, G., 2013. VAC Protocol for Treatment of Dogs with Stage III Hemangiosarcoma. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 49, 370–377. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5954>
- Anguille, S., Smits, E.L., Lion, E., van Tendeloo, V.F., Berneman, Z.N., 2014. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol.* 15, e257–267. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70585-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70585-0)
- Batschinski, K., Nobre, A., Vargas-Mendez, E., Tedardi, M.V., Cirillo, J., Cestari, G., Ubukata, R., Dagli, M.L.Z., 2018. Canine visceral hemangiosarcoma treated with surgery alone or surgery and doxorubicin: 37 cases (2005–2014) 59, 6.
- Bol, K.F., Schreibelt, G., Gerritsen, W.R., de Vries, I.J.M., Figdor, C.G., 2016. Dendritic Cell–Based Immunotherapy: State of the Art and Beyond. *Clin. Cancer Res.* 22, 1897–1906. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1399>
- Boston, S.E., Higginson, G., Monteith, G., 2011. Concurrent Splenic and Right Atrial Mass at Presentation in Dogs with HSA: A Retrospective Study. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 47, 336–341. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5603>
- Bray, J.P., Orbell, G., Cave, N., Munday, J.S., 2018. Does thalidomide prolong survival in dogs with splenic haemangiosarcoma? *J. Small Anim. Pract.* 59, 85–91. <https://doi.org/10.1111/jsap.12796>
- Brown, N.O., Patnaik, A.K., MacEwen, E.G., 1985. Canine hemangiosarcoma: retrospective analysis of 104 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186, 56–58.
- Broz, M.L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A.E., Pollack, J.L., Erle, D.J., Barczak, A., Rosenblum, M.D., Daud, A., Barber, D.L., Amigorena, S., Van't Veer, L.J., Sperling, A.I., Wolf, D.M., Krummel, M.F., 2014. Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell* 26, 638–652. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.007>
- Carnio, A., Eleni, C., Cocumelli, C., Bartolomé Del Pino, L.E., Simeoni, S., Spallucci, V., Scaramozzino, P., 2020. Evaluation of intrinsic and extrinsic risk factors for dog visceral hemangiosarcoma: A retrospective case-control study register-based in Lazio region, Italy. *Prev. Vet. Med.* 181, 105074. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105074>
- Clendaniel, D.C., Sivacolundhu, R.K., Sorenmo, K.U., Donovan, T.A., Turner, A., Arteaga, T., Bergman, P.J., 2014. Association between macroscopic appearance of liver lesions and liver histology in dogs with splenic hemangiosarcoma: 79 cases (2004–2009). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 50, e6–10. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6059>
- Cleveland, M.J., Casale, S., 2016. Incidence of malignancy and outcomes for dogs undergoing splenectomy for incidentally detected nonruptured splenic nodules or masses: 105 cases (2009–2013). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 248, 1267–1273. <https://doi.org/10.2460/javma.248.11.1267>
- Clifford, C.A., Mackin, A.J., Henry, C.J., 2000. Treatment of Canine

- Hemangiosarcoma: 2000 and Beyond. *J. Vet. Intern. Med.* 14, 479–485. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02262.x>
- Davies, O., Taylor, A.J., 2020. Refining the “double two-thirds” rule: Genotype-based breed grouping and clinical presentation help predict the diagnosis of canine splenic mass lesions in 288 dogs. *Vet. Comp. Oncol.* 18, 548–558. <https://doi.org/10.1111/vco.12574>
- De Nardi, A.B., de Oliveira Massoco Salles Gomes, C., Fonseca-Alves, C.E., de Paiva, F.N., Linhares, L.C.M., Carra, G.J.U., Dos Santos Horta, R., Ruiz Sueiro, F.A., Jark, P.C., Nishiya, A.T., de Carvalho Vasconcellos, C.H., Ubukata, R., Batschinski, K., Sobral, R.A., Fernandes, S.C., Biondi, L.R., De Francisco Strefezzi, R., Matera, J.M., Rangel, M.M.M., Dos Anjos, D.S., Brunner, C.H.M., Laufer-Amorim, R., Cadrobbi, K.G., Cirillo, J.V., Martins, M.C., de Paula Reis Filho, N., Silva Lessa, D.F., Portela, R., Scarpa Carneiro, C., Ricci Lucas, S.R., Fukumasu, H., Feliciano, M.A.R., Gomes Quitzan, J., Dagli, M.L.Z., 2023. Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Canine Hemangiosarcoma: A Review Based on a Consensus Organized by the Brazilian Association of Veterinary Oncology, ABROVET. *Cancers* 15, 2025. <https://doi.org/10.3390/cancers15072025>
- De Silva, N.H., Akazawa, T., Wijewardana, V., Inoue, N., Oyamada, M., Ohta, A., Tachibana, Y., Wijesekera, D.P.H., Kuwamura, M., Nishizawa, Y., Itoh, K., Izawa, T., Hatoya, S., Hasegawa, T., Yamate, J., Inaba, T., Sugiura, K., 2017. Development of effective tumor immunotherapy using a novel dendritic cell-targeting Toll-like receptor ligand. *PloS One* 12, e0188738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188738>
- De Vries, I.J.M., Krooshoop, D.J.E.B., Scharenborg, N.M., Lesterhuis, W.J., Diepstra, J.H.S., Van Muijen, G.N.P., Strijk, S.P., Ruers, T.J., Boerman, O.C., Oyen, W.J.G., Adema, G.J., Punt, C.J.A., Figdor, C.G., 2003. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res.* 63, 12–17.
- Draube, A., Klein-González, N., Mattheus, S., Brillant, C., Hellmich, M., Engert, A., von Bergwelt-Baildon, M., 2011. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS One* 6, e18801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018801>
- Eberle, N., von Babo, V., Nolte, I., Baumgärtner, W., Betz, D., 2012. Splenic masses in dogs. Part 1: Epidemiologic, clinical characteristics as well as histopathologic diagnosis in 249 cases (2000-2011). *Tierarztl. Prax. Ausg. K Klientiere Heimtiere* 40, 250–260.
- Faroni, E., Sabattini, S., Guerra, D., Iannuzzi, C., Chalfon, C., Agnoli, C., Stefanello, D., Polton, G., Ramos, S., Aralla, M., Ciaccini, R., Foglia, A., Okonji, S., Marconato, L., 2023. Timely adjuvant chemotherapy improves outcome in dogs with non-metastatic splenic hemangiosarcoma undergoing splenectomy. *Vet. Comp. Oncol.* 21, 123–130. <https://doi.org/10.1111/vco.12875>
- Faulhaber, E.A., Janik, E., Thamm, D.H., 2021. Adjuvant carboplatin for treatment of splenic hemangiosarcoma in dogs: Retrospective evaluation of 18 cases (2011-2016) and comparison with doxorubicin-based chemotherapy. *J. Vet. Intern. Med.* 35, 1929–1934. <https://doi.org/10.1111/jvim.16212>
- Gardner, A., de Mingo Pulido, Á., Ruffell, B., 2020. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. *Front. Immunol.* 11.
- Gardner, H.L., London, C.A., Portela, R.A., Nguyen, S., Rosenberg, M.P., Klein, M.K., Clifford, C., Thamm, D.H., Vail, D.M., Bergman, P., Crawford-

- Jakubiak, M., Henry, C., Locke, J., Garrett, L.D., 2015. Maintenance therapy with toceranib following doxorubicin-based chemotherapy for canine splenic hemangiosarcoma. *BMC Vet. Res.* 11, 131. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0446-1>
- Garg, A.D., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., Agostinis, P., 2017. Integrating Next-Generation Dendritic Cell Vaccines into the Current Cancer Immunotherapy Landscape. *Trends Immunol.* 38, 577–593. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.05.006>
- Grammel, T., 2016. A pilot, uncontrolled study of postsurgical treatment with autologous dendritic cell-based immunologic therapy in 10 dogs with splenic hemangiosarcoma. *3rd World Vet. Conf. Foz IgnassuBrazil May 25-292015.*
- Griffin, M.A., Culp, W.T.N., Rebhun, R.B., 2021. Canine and feline haemangiosarcoma. *Vet. Rec.* 189, e585. <https://doi.org/10.1002/vetr.585>
- Gyorffy, S., Rodriguez-Lecompte, J.C., Woods, J.P., Foley, R., Kruth, S., Liaw, P.C.Y., Gauldie, J., 2005. Bone Marrow-Derived Dendritic Cell Vaccination of Dogs with Naturally Occurring Melanoma by Using Human gp100 Antigen. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 56. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2005\)19<56:BMDCVO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2005)19<56:BMDCVO>2.0.CO;2)
- Hammer, A.S., Couto, C.G., Swardson, C., Getzy, D., 1991. Hemostatic abnormalities in dogs with hemangiosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 5, 11–14. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1991.tb00923.x>
- Hammond, T.N., Pesillo-Crosby, S.A., 2008. Prevalence of hemangiosarcoma in anemic dogs with a splenic mass and hemoperitoneum requiring a transfusion: 71 cases (2003–2005). *Sci. Rep.* 232, 6.
- PetBioCell GmbH. <https://www.petbiocell.de/dendritische-zelltherapie>, (accessed 10.02.2024)
- Indelicato, D.J., Finkelstein, S.E., 2012. Dendritic cell immunotherapy in soft tissue sarcoma. *Immunotherapy* 4, 1023–1029. <https://doi.org/10.2217/imt.12.106>
- Jung, N.-C., Lee, J.-H., Chung, K.-H., Kwak, Y.S., Lim, D.-S., 2018. Dendritic Cell-Based Immunotherapy for Solid Tumors. *Transl. Oncol.* 11, 686–690. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.03.007>
- Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R.B., Xu, Y., Frohlich, M.W., Schellhammer, P.F., 2010. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 363, 411–422. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001294>
- Kim, J.-H., Graef, A., Dickerson, E., Modiano, J., 2015. Pathobiology of Hemangiosarcoma in Dogs: Research Advances and Future Perspectives. *Vet. Sci.* 2, 388–405. <https://doi.org/10.3390/vetsci2040388>
- Kim, S.E., Liptak, J.M., Gall, T.T., Monteith, G.J., Woods, J.P., 2007. Epirubicin in the adjuvant treatment of splenic hemangiosarcoma in dogs: 59 cases (1997-2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231, 1550–1557. <https://doi.org/10.2460/javma.231.10.1550>
- Klingemann, H., 2021. Immunotherapy for Dogs: Still Running Behind Humans. *Front. Immunol.* 12.
- Konduri, V., Halpert, M.M., Baig, Y.C., Coronado, R., Rodgers, J.R., Levitt, J.M., Cerroni, B., Piscoya, S., Wilson, N., DiBernardi, L., Omarbekov, Z., Seelhoff, L., Ravi, V., Douglass, L., Decker, W.K., 2019. Dendritic cell vaccination plus low-dose doxorubicin for the treatment of spontaneous canine hemangiosarcoma. *Cancer Gene Ther.* 26, 282–291. <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0080-3>

- Kutara, K., Seki, M., Ishigaki, K., Teshima, K., Ishikawa, C., Kagawa, Y., Edamura, K., Nakayama, T., Asano, K., 2017. Triple-phase helical computed tomography in dogs with solid splenic masses. *J. Vet. Med. Sci.* 79, 1870–1877. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0253>
- Lamerato-Kozicki, A.R., Helm, K.M., Jubala, C.M., Cutter, G.C., Modiano, J.F., 2006. Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with potential for endothelial differentiation. *Exp. Hematol.* 34, 870–878. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.04.013>
- Lee, A.W., Truong, T., Bickham, K., Fonteneau, J.-F., Larsson, M., Da Silva, I., Somersan, S., Thomas, E.K., Bhardwaj, N., 2002. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 20 Suppl 4, A8–A22. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00382-1](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00382-1)
- Lee, K.-W., Yam, J.W.P., Mao, X., 2023. Dendritic Cell Vaccines: A Shift from Conventional Approach to New Generations. *Cells* 12, 2147. <https://doi.org/10.3390/cells12172147>
- Lim, D.-S., Kim, J.-H., Lee, D.-S., Yoon, C.-H., Bae, Y.-S., 2007. DC immunotherapy is highly effective for the inhibition of tumor metastasis or recurrence, although it is not efficient for the eradication of established solid tumors. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 56, 1817–1829. <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0325-0>
- Maeda, S., 2023. Second era of molecular-targeted cancer therapies in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 85, 790–798. <https://doi.org/10.1292/jvms.23-0204>
- Makker, S., Galley, C., Bennett, C.L., 2024. Cancer vaccines: from an immunology perspective. *Immunother. Adv.* 4, Itad030. <https://doi.org/10.1093/immadv/ltad030>
- Marconato, L., Chalfon, C., Finotello, R., Polton, G., Vasconi, M.E., Annoni, M., Stefanello, D., Mesto, P., Capitani, O., Agnoli, C., Amati, M., Sabattini, S., 2019. Adjuvant anthracycline-based vs metronomic chemotherapy vs no medical treatment for dogs with metastatic splenic hemangiosarcoma: A multi-institutional retrospective study of the Italian Society of Veterinary Oncology. *Vet. Comp. Oncol.* 17, 537–544. <https://doi.org/10.1111/vco.12519>
- Marconato, L., Tiraboschi, L., Aralla, M., Sabattini, S., Melacarne, A., Agnoli, C., Balboni, A., Salvi, M., Foglia, A., Punzi, S., Romagnoli, N., Rescigno, M., 2023. A Phase 2, Single-Arm, Open-Label Clinical Trial on Adjuvant Peptide-Based Vaccination in Dogs with Aggressive Hemangiosarcoma Undergoing Surgery and Chemotherapy. *Cancers* 15, 4209. <https://doi.org/10.3390/cancers15174209>
- Maruyama, H., Miura, T., Sakai, M., Koie, H., Yamaya, Y., Shibuya, H., Sato, T., Watari, T., Takeuchi, A., Tokuriki, M., Hasegawa, A., 2004. The incidence of disseminated intravascular coagulation in dogs with malignant tumor. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 573–575. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.573>
- Masyr, A.R., Rendahl, A.K., Winter, A.L., Borgatti, A., Modiano, J.F., 2021. Retrospective evaluation of thrombocytopenia and tumor stage as prognostic indicators in dogs with splenic hemangiosarcoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 258, 630–637. <https://doi.org/10.2460/javma.258.6.630>
- Matsuyama, A., Poirier, V.J., Mantovani, F., Foster, R.A., Mutsaers, A.J., 2017. Adjuvant Doxorubicin with or without Metronomic Cyclophosphamide for Canine Splenic Hemangiosarcoma. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 53, 304–312. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6540>
- Michael, A.E., Grimes, J.A., Rajeev, M., Wallace, M.L., Schmiedt, C.W., 2023.

- Perioperative ventricular arrhythmias are increased with hemoperitoneum and are associated with increased mortality in dogs undergoing splenectomy for splenic masses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 261, 1–6. <https://doi.org/10.2460/javma.23.05.0289>
- Mito, K., Sugiura, K., Ueda, K., Hori, T., Akazawa, T., Yamate, J., Nakagawa, H., Hatoya, S., Inaba, M., Inoue, N., Ikehara, S., Inaba, T., 2010. IFN $\{\gamma\}$ markedly cooperates with intratumoral dendritic cell vaccine in dog tumor models. *Cancer Res.* 70, 7093–7101. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0600>
- Moore, A.S., Rassnick, K.M., Frimberger, A.E., 2017. Evaluation of clinical and histologic factors associated with survival time in dogs with stage II splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy and adjuvant chemotherapy: 30 cases (2011–2014). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 251, 559–565. <https://doi.org/10.2460/javma.251.5.559>
- Mullin, C., Clifford, C.A., 2019. Histiocytic Sarcoma and Hemangiosarcoma Update. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 49, 855–879. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.04.009>
- Musser, M.L., Coto, G.M., Lingnan, Y., Mochel, J.P., Johannes, C.M., 2022. Pilot safety evaluation of doxorubicin chemotherapy combined with non-specific immunotherapy (Immunocidin®) for canine splenic hemangiosarcoma. *PloS One* 17, e0279594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279594>
- Najafi, S., Mortezaee, K., 2023. Advances in dendritic cell vaccination therapy of cancer. *Biomed. Pharmacother.* 164, 114954. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114954>
- Nava, S., Lisini, D., Frigerio, S., Bersano, A., 2021. Dendritic Cells and Cancer Immunotherapy: The Adjuvant Effect. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 12339. <https://doi.org/10.3390/ijms222212339>
- Ogilvie, G.K., Powers, B.E., Mallinckrodt, C.H., Withrow, S.J., 1996. Surgery and doxorubicin in dogs with hemangiosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 10, 379–384. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1996.tb02085.x>
- Prymak, C., McKee, L.J., Goldschmidt, M.H., Glickman, L.T., 1988. Epidemiologic, clinical, pathologic, and prognostic characteristics of splenic hemangiosarcoma and splenic hematoma in dogs: 217 cases (1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 706–712.
- Reck, A., Gedon, J., Kessler, M., 2023. Adjuvante Behandlung des caninen Hämangiosarkoms der Milz mit der autologen dendritischen Zelltherapie – eine prospektive, placebokontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie. *Tierärztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere* 51, 394–402. <https://doi.org/10.1055/a-2197-9906>
- Robinson, K.L., Bryan, M.E., Atkinson, E.S., Keeler, M.R., Hahn, A.W., Bryan, J.N., 2020. Neutering is associated with developing hemangiosarcoma in dogs in the Veterinary Medical Database: An age and time-period matched case-control study (1964–2003). *Can. Vet. J.* 61, 499–504.
- Sadeghi Najafabadi, S.A., Bolhassani, A., Aghasadeghi, M.R., 2022. Tumor cell-based vaccine: an effective strategy for eradication of cancer cells. *Immunotherapy* 14, 639–654. <https://doi.org/10.2217/imt-2022-0036>
- Sadeghzadeh, M., Bornehdeli, S., Mohahammadrezakhani, H., Abolghasemi, M., Poursaei, E., Asadi, M., Zafari, V., Aghebati-Maleki, L., Shanehbandi, D., 2020. Dendritic cell therapy in cancer treatment; the state-of-the-art. *Life Sci.* 254, 117580. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117580>
- Schick, A.R., Grimes, J.A., 2022. Evaluation of the validity of the double two-thirds rule for diagnosing hemangiosarcoma in dogs with nontraumatic

- hemoperitoneum due to a ruptured splenic mass: a systematic review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 261, 69–73. <https://doi.org/10.2460/javma.22.08.0389>
- Schmidt, J., Eisold, S., Büchler, M.W., Märten, A., 2004. Dendritic cells reduce number and function of CD4+CD25+ cells in cytokine-induced killer cells derived from patients with pancreatic carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 53, 1018–1026. <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0554-4>
- Schnurr, M., Galambos, P., Scholz, C., Dauer, M., Krug, A., Hartmann, G., Eigler, A., Endres, S., 2002. Dendritische Zellen – Träger tumorgerichteter Immuntherapie. *Dtsch. Ärztebl.* 6.
- Schultheiss, P.C., 2004. A retrospective study of visceral and nonvisceral hemangiosarcoma and hemangiomas in domestic animals. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 16, 522–526. <https://doi.org/10.1177/104063870401600606>
- Sherwood, J.M., Haynes, A.M., Klocke, E., Higginbotham, M.L., Thomson, E.M., Weng, H.-Y., Towle Millard, H.A., 2016. Occurrence and Clinicopathologic Features of Splenic Neoplasia Based on Body Weight: 325 Dogs (2003-2013). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 52, 220–226. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6346>
- Smith, A.N., 2003. Hemangiosarcoma in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 533–552, vi. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(03\)00002-0](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(03)00002-0)
- Sorenmo, K., Samluk, M., Clifford, C., Baez, J., Barrett, J.S., Poppenga, R., Overley, B., Skorupski, K., Oberthaler, K., Van Winkle, T., Seiler, G., Shofer, F., 2007. Clinical and pharmacokinetic characteristics of intracavitary administration of pegylated liposomal encapsulated doxorubicin in dogs with splenic hemangiosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 1347–1354. <https://doi.org/10.1892/06-214.1>
- Sorenmo, K.U., Baez, J.L., Clifford, C.A., Mauldin, E., Overley, B., Skorupski, K., Bachman, R., Samluk, M., Shofer, F., 2004. Efficacy and toxicity of a dose-intensified doxorubicin protocol in canine hemangiosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 209–213. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2004\)18<209:eatoad>2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2004)18<209:eatoad>2.0.co;2)
- Sutherland, S.I.M., Ju, X., Horvath, L.G., Clark, G.J., 2021. Moving on From Sipuleucel-T: New Dendritic Cell Vaccine Strategies for Prostate Cancer. *Front. Immunol.* 12, 641307. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.641307>
- Treggiari, E., Borrego, J.F., Gramer, I., Valenti, P., Harper, A., Finotello, R., Toni, C., Laomedonte, P., Romanelli, G., 2020. Retrospective comparison of first-line adjuvant anthracycline vs metronomic-based chemotherapy protocols in the treatment of stage I and II canine splenic haemangiosarcoma. *Vet. Comp. Oncol.* 18, 43–51. <https://doi.org/10.1111/vco.12548>
- U'Ren, L.W., Biller, B.J., Elmslie, R.E., Thamm, D.H., Dow, S.W., 2007. Evaluation of a novel tumor vaccine in dogs with hemangiosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 113–120. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2007\)21\[113:eoantv\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[113:eoantv]2.0.co;2)
- Vail, D., Macewen, E., Kurzman, I., Dubielzig, R., Helfand, S., Kisseberth, W., London, C., Obradovich, J., Madewell, B., Rodriguez, C., 1995. Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine adjuvant immunotherapy for splenic hemangiosarcoma in the dog: a randomized multi-institutional clinical trial. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*
- Vail, D.M., Withrow, S.J., 2019. Mullin C, Clifford CA. Miscellaneous tumors:

- Hemangiosarcoma. In: Withrow SJ, Vail DM, Page RL. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. Elsevier Health Sciences, 2019: 773-778, in: Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology.
- van Gulijk, M., Dammeijer, F., Aerts, J.G.J.V., Vroman, H., 2018. Combination Strategies to Optimize Efficacy of Dendritic Cell-Based Immunotherapy. *Front. Immunol.* 9, 2759. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02759>
- Waters, D.J., Caywood, D.D., Hayden, D.W., Klausner, J.S., 1988. Metastatic pattern in dogs with splenic haemangiosarcoma: Clinical implications. *J. Small Anim. Pract.* 29, 805–814. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1988.tb01907.x>
- Waters, D.J., Hayden, D.W., Walter, P.A., 1989. Intracranial lesions in dogs with hemangiosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 3, 222–230. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1989.tb00861.x>
- Wendelburg, K.M., O'Toole, T.E., McCobb, E., Price, L.L., Lyons, J.A., Berg, J., 2014. Risk factors for perioperative death in dogs undergoing splenectomy for splenic masses: 539 cases (2001–2012). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 245, 1382–1390. <https://doi.org/10.2460/javma.245.12.1382>
- Wendelburg, K.M., Price, L.L., Burgess, K.E., Lyons, J.A., Lew, F.H., Berg, J., 2015. Survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy with or without adjuvant chemotherapy: 208 cases (2001–2012). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 247, 393–403. <https://doi.org/10.2460/javma.247.4.393>
- Wood, C., Moore, A., Gliatto, J., Ablin, L., Berg, R., Rand, W., 1998. Prognosis for dogs with stage I or II splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy alone: 32 cases (1991-1993). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 34, 417–421. <https://doi.org/10.5326/15473317-34-5-417>
- Yankin, I., Nemanic, S., Funes, S., de Morais, H., Gorman, E., Ruaux, C., 2020. Clinical relevance of splenic nodules or heterogeneous splenic parenchyma assessed by cytologic evaluation of fine-needle samples in 125 dogs (2011-2015). *J. Vet. Intern. Med.* 34, 125–131. <https://doi.org/10.1111/jvim.15648>

VIII. DANKSAGUNG

Ich möchte mich hiermit herzlich bei Herrn Prof. Dr. Johannes Hirschberger für die Betreuung dieser Dissertation bedanken. Ich danke ihm insbesondere für seine raschen Rückmeldungen bei Fragen bzw. Unklarheiten und für seine freundliche Art.

Meinem Mentor Dr. Martin Kessler gilt mein besonderer Dank für die überaus gute und motivierende Betreuung, seine raschen Korrekturen und sein offenes Ohr bei Fragen. Ich bin für diese lehrreiche Zeit bei ihm sehr dankbar.

Ein sehr großer Dank gilt der gesamten Abteilung der Onkologie in der Tierklinik Hofheim, die mich bei der Durchführung dieser prospektiven Studie immer unterstützt hat.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für ihre Unterstützung und Ermutigungen, nicht nur während der Arbeit an meiner Dissertation, sondern auch allgemein während meines Studiums.

Luc Zimny danke ich sehr für die Hilfe bei der Durchführung der Statistik.

Markus Loose danke ich von Herzen für die Unterstützung und Geduld, die er mir während meines Studiums, bei Beginn meiner beruflichen Laufbahn sowie bei der Arbeit an dieser Dissertation entgegengebracht hat. Ich bin für seine uneingeschränkten Aufmunterungen, seine Motivierung und Zuversicht sehr dankbar.