

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

Thermosensitives Liposomales Doxorubicin (DPPG₂-TSL-DOX)
simultan mit regionaler Hyperthermie als initiale Therapie von
inoperablen Weichteilsarkomen

Von Christina Ratzlaff

aus Berlin

München 2025

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

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. Heidrun Potschka

Tag der Promotion: 26. Juli 2025

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	4
1.	Das Fibrosarkom bei der Katze	4
1.1.	Hintergrundinformationen.....	4
1.2.	Diagnostik	5
1.3.	Therapie.....	6
2.	Doxorubicin.....	8
3.	Pharmakokinetik von freiem DOX.....	8
4.	Liposomen	9
4.1.	Entstehung der Liposomen.....	9
4.2.	Wirkstofffreisetzung aus den Liposomen	13
4.3.	Toxizität der Liposomen	15
4.3.1.	Lokale Toxizität	15
4.3.2.	Systemische Toxizität	16
5.	Hyperthermie.....	18
5.1.	Hintergrundinformationen.....	18
5.2.	Wirkung der Hyperthermie	19
5.3.	Kombinationstherapien mit Hyperthermie und deren Einsatzgebiete.....	20
5.3.1.	Humanmedizin	22
5.3.2.	Veterinärmedizin	24
5.4.	Hyperthermie-bedingte Nebenwirkungen	25
6.	Zielpunkt der Studie	25
III.	MATERIAL UND METHODEN	27
1.	Rekrutierung der Patienten.....	27
1.1.	Therapiegruppe I	27
1.2.	Therapiegruppe II.....	28
2.	Voruntersuchungen.....	28
2.1.	Therapiegruppe I	28
2.2.	Therapiegruppe II.....	29

3.	Therapieprotokoll.....	30
3.1.	Therapiegruppe I	30
3.1.1.	Untersuchungen während der Therapie.....	30
3.1.2.	Abschlussuntersuchungen nach den Therapiezyklen.....	30
3.2.	Therapiegruppe II.....	31
4.	Anwendung der regionalen Hyperthermie	31
4.1.	Therapiegruppe I	31
4.1.1.	Ablauf der regionalen Hyperthermie.....	31
4.1.2.	Anästhesie	33
4.1.3.	Probenentnahme von Blutplasma.....	34
4.2.	Therapiegruppe II.....	35
4.2.1.	Ablauf der Hyperthermie und Anästhesie	35
4.2.2.	Probenentnahme	35
4.2.2.1.	Chirurgische Exzision des Tumors	35
4.2.2.2.	Probenentnahme von Blutplasma.....	35
5.	Herstellung und Charakterisierung der Liposomen.....	36
6.	Pharmakokinetik.....	37
6.1.	Bestimmung der DOX-Konzentration in Blut- und Gewebeproben beider Therapiegruppen.....	37
6.2.	Ermittlung der AUC und ID.....	37
7.	Bestimmung der Toxizität	38
7.1.	Therapiegruppe I	38
7.2.	Therapiegruppe II.....	38
8.	Tumoransprechen	38
9.	Chirurgie und Strahlentherapie nach Abschluss der Therapiestudie	39
9.1.	Therapiegruppe I	39
9.2.	Therapiegruppe II.....	39
10.	Follow-up.....	40
10.1.	Therapiegruppe I	40
10.2.	Therapiegruppe II.....	40
IV.	ERGEBNISSE	41
1.	Patientendaten	41

1.1.	Therapiegruppe I	41
1.2.	Therapiegruppe II	41
2.	Behandlungszyklen von Therapiegruppe I	42
3.	Toxizität	42
3.1.	Lokale Toxizität	42
3.2.	Systemische Toxizität	43
3.2.1.	Therapiegruppe I	43
3.2.2.	Therapiegruppe II	45
4.	Abschlussuntersuchung der Therapiegruppe I	46
5.	Tumoransprechen der Therapiegruppe I	46
6.	Hyperthermie	48
6.1.	Therapiegruppe I	48
6.2.	Therapiegruppe II	48
7.	Pharmakokinetik	49
8.	DOX-Konzentration im Tumorgewebe von Therapiegruppe II	51
9.	Weiterführende Therapie nach Abschluss der Behandlungszyklen ...	52
9.1.	Therapiegruppe I	52
9.2.	Therapiegruppe II	52
10.	Follow-up der Therapiegruppe I	53
V.	DISKUSSION	55
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	68
VII.	SUMMARY	71
VIII.	TABELLENVERZEICHNIS	73
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
X.	LITERATURVERZEICHNIS	75
XI.	ANHANG	92
1.	Studienprotokoll	92
1.1.	Studienprotokoll Therapiegruppe I	92
1.2.	Studienprotokoll Therapiegruppe II	94

2.	Tumorcharakteristika und Tumoransprechen der Therapiegruppe I ...	95
3.	Tumorcharakteristika der Therapiegruppe II.....	96
4.	Weiterführende Therapie	97
4.1.	Weiterführende Therapie der Therapiegruppe I.....	97
4.2.	Weiterführende Therapie der Therapiegruppe II	98
5.	DPPG₂-TSL-DOX-Chargen	99
5.1.	Charge [26/24D].....	99
5.2.	Charge 30-29D	100
6.	Daten zur Hyperthermie.....	101
6.1.	Hyperthermie-Daten Therapiegruppe I	101
6.2.	Hyperthermie-Daten Therapiegruppe II.....	102
7.	Systemische Toxizität.....	103
7.1.	Therapiegruppe I	103
7.1.1.	Erythrozyten	103
7.1.1.1.	Hämoglobin.....	103
7.1.1.2.	Hämatokrit.....	104
7.1.2.	Leukozyten	105
7.1.2.1.	Gesamtleukozyten	105
7.1.2.2.	Neutrophile Granulozyten	106
7.1.2.3.	Thrombozyten	107
7.1.3.	Nierenwerte	108
7.1.3.1.	Kreatinin.....	108
7.1.3.2.	Harnstoff.....	109
7.1.4.	Körpergewicht	110
7.2.	Systemische Toxizität Therapiegruppe II	111
XII.	DANKSAGUNG	113

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AUC	Area under the curve
CARPA	Complement activation-related pseudoallergy
CEM ₄₃	Kumulative äquivalente Minuten bei einer Temperatur von 43 °C
CT	Computertomographie
CTCAE	Common Toxicity Criteria Adverse Events
DOX	Doxorubicin
DPPG	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
DPPG ₂	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphodiglycerol
EPR-Effekt	Enhanced permeability and retention effect
FISS	Felines Injektions-assoziiertes Fibrosarkom
FeLV	Felines Leukämie-Virus
HSP	Hitzeschockprotein
LTLD	Lyso-thermosensitives liposomales Doxorubicin
LTSL	Low-thermosensitive liposome
MRT	Magnetresonanztomographie
PEG	Methoxypolyethylenglykol
PEGylierung	Bindung von Methoxypolyethylenglykol
PET-MRT	Positronen-Emissions-Tomographie- Magnetresonanztomographie
QMHT	Quality management in hyperthermia
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumours
RES	Retikuloendotheliales System
RHT	Regionale Hyperthermie
T ₅₀	Die während der Therapie median gemessene Temperatur im Tumor

T ₉₀	Die Temperatur, die in 90 % der Fälle erreicht oder überschritten wurde
T _m	Phasenumwandlungstemperatur
TDI	Thermal isoeffect dose
TSL	Thermosensitives Liposom
US	Untersuchung

I. EINLEITUNG

Das feline Fibrosarkom ist ein häufig bei der Katze anzutreffender mesenchymaler Tumor, der sich im umgebenden Gewebe aggressiv und invasiv verhält. Eine Diagnosestellung der Umfangsvermehrung erfolgt entweder mit Hilfe einer zytologischen Untersuchung, die jedoch nur bei 50 % der Fälle diagnostisch ist oder mittels einer histologischen Untersuchung (MARTANO et al. 2011). Bisher wird eine multimodale Therapie, bestehend aus einer weiträumigen chirurgischen Exzision des Tumors, kombiniert mit einer strahlen- und chemotherapeutischen Behandlung zur Verbesserung der Rezidiv-freien Zeit, empfohlen, da die Rezidivrate bei einer alleinigen chirurgischen Behandlung mit 45 % bis 70 % beschrieben ist (DAVIDSON et al. 1997, CRONIN et al. 1998, KOBAYASHI et al. 2002, MARTANO et al. 2011). Bei einer histologisch vollständigen Tumorentfernung kann die Rezidivrate auch bei 14 % bis 50 % liegen (MCENTEE und PAGE 2001, PHELPS et al. 2011). In einer aktuelleren Studie von Müller und Kessler wurden bei Katzen mit feline Injektions-assoziierten Fibrosarkomen (FISS) Rezidivraten von 33 % bis 55 % bei einer radikalen kurativen Operation von Primärtumoren und Rezidiven, in Abhängigkeit von Faktoren wie einer Operation des Primärtumors im Vergleich zu einem Rezidiv, tumorfreien Resektionsrändern und der Lokalisation des Tumors, dokumentiert (MÜLLER und KESSLER 2018). Für die Planung der Operation ist eine vorangehende Bildgebung mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) ratsam, um die Ausdehnung vor allem in der Tiefe zu evaluieren (LADLOW 2013). Die Zeit bis zu einer erneuten Rezidiv-Bildung ist abhängig von dem aggressiven radikalen Vorgehen des Operators, wobei das Vorliegen von histologisch tumorfreien Exzisionsrändern ein erneutes Rezidiv nicht ausschließt (HERSHEY et al. 2000). Viele Katzen werden jedoch mit einem bereits inoperablen Tumor vorgestellt, bei dem die Therapieoptionen limitiert sind. Das Chemotherapeutikum Doxorubicin (DOX) wird überwiegend als neoadjuvante Therapie eingesetzt. Die maximal tolerierbare Dosis von klassischem DOX beträgt bei der Katze 1,0 mg/kg. Bei der Therapie des Hochrisikoweichteilsarkoms des Menschen wird ebenfalls eine multimodale Therapie empfohlen. Den Unterschied zu der multimodalen Therapie bei dem feline Fibrosarkom bildet hierbei die zusätzliche Therapie mit einer regionalen Erwärmung des Tumors, der Hyperthermie. Bei hohen Temperaturen

kommt es durch die Hyperthermie zu einer direkten Zytotoxizität. *In vitro* herrscht bei milden Temperaturen zwischen 40 °C und 43 °C ein tumorselektiver Effekt. Tumoren weisen aufgrund ihres ungeordneten Gefäßaufbaus hypoxische Regionen und Areale mit niedrigem pH-Wert auf, die nicht in normalem Gewebe existieren. Eine Hyperthermie kann die hypoxischen Areale reduzieren (ISSELS 2008, LANDON et al. 2011). Hyperthermie sensibilisiert den Tumor für eine Chemotherapie und Strahlentherapie. Die Wirksamkeit des Chemotherapeutikums wird durch eine verbesserte Aufnahme des Medikamentes in die Zelle und durch eine Hemmung der Reparatur von sublethalen Zellschäden des Medikamentes gesteigert. Die Sensibilisierung für eine Strahlentherapie liegt in einer verbesserten Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes. Außerdem löst die Bildung von Hitzeschockproteinen (HSP), insbesondere HSP70, durch die absterbenden Tumorzellen eine Immunantwort aus (MILANI et al. 2002, ISSELS 2008).

Bei der Anwendung des Chemotherapeutikums DOX werden bei der Katze systemische Nebenwirkungen, wie gastrointestinale Symptome, eine Myelosuppression sowie eine kumulative Nephrotoxizität, beschrieben. Durch die Verwendung von Liposomen als Wirkstoffträger für beispielsweise Chemotherapeutika kann das Auftreten von systemischen Nebenwirkungen reduziert werden. Liposomen bestehen aus einer, ein wässriges Kompartiment einschließenden, Lipid-Doppelschicht. Das Kompartiment kann mit hydrophilen Arzneimitteln beladen werden (TORCHILIN 2005, LINDNER und HOSSANN 2010). Doxil® (registriert in Europa als Caelyx®) ist ein nicht-thermosensitives, PEGyliertes mit DOX beladenes Liposom. Im Vergleich zu freiem DOX zeigte sich bei Doxil® ein verbessertes Nebenwirkungsprofil, jedoch war keine Verbesserung des Therapieeffektes zu beobachten (JUDSON et al. 2001, POIRIER et al. 2002, LANDON et al. 2011). Mit der Erforschung thermosensitiver Liposomen (TSL) konnte eine Wirkstofffreisetzung in das Zielgewebe durch einen externen Stimulus wie eine Hyperthermie realisiert werden (LANDON et al. 2011, LI et al. 2013, KNEIDL et al. 2014). Bei der Phasenumwandlungstemperatur (T_m), die üblicherweise zwischen 39 °C und 42 °C liegt, wird der Wirkstoff durch eine Permeabilitätsänderung der Phospholipid-Doppelmembran intravaskulär freigesetzt und ist in größeren Mengen bioverfügbar (LINDNER und HOSSANN 2010, MANZOOR et al. 2012, LI et al. 2013). Die Phospholipide gehen hierbei von einer soliden Gel-Phase, die durch eine geringe Permeabilität für flüssige

Komponenten gekennzeichnet ist, in eine ungeordnete flüssige Phase mit erhöhter Permeabilität über (KNEIDL et al. 2014). Eine vielversprechende TSL-Formulierung mit eingeschlossenem DOX ist die auf dem synthetischen Phospholipid 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphodiglycerol (DPPG₂) basierende DPPG₂-TSL-DOX (WILLERDING et al. 2016, HOSSANN et al. 2021).

In vorangegangenen Studien fand die Kombinationstherapie aus regionaler Hyperthermie (RHT) und DPPG₂-TSL-DOX bei inoperablen Fibrosarkomen von Katzen aus Privatbesitz Anwendung (ZIMMERMANN 2014, TROEDSON 2015). Diese thermosensitive liposomale Formulierung wurde im Jahr 2004 erstmals von Lindner et al. beschrieben (LINDNER et al. 2004). In einem Fibrosarkom-Modell bei Nagetieren wurde diese Formulierung mit anderen Formulierungen (freier Wirkstoff, eine nicht-thermosensitive und eine thermosensitive Formulierung) verglichen und zeigte vielversprechende Ergebnisse (SCHMIDT 2011). Bei Zimmermann wurde das DPPG₂-TSL-DOX in Dosierungen zwischen 0,1 mg/kg und 0,4 mg/kg eingesetzt (ZIMMERMANN 2014). Ein therapeutischer Effekt zeigte sich bereits in einer Dosierung von 0,2 mg/kg. Vergleichend hierzu beträgt die Standarddosis von freiem DOX 1,0 mg/kg. Es wurden milde Nebenwirkungen der Hyperthermie festgestellt, aber keine systemischen Nebenwirkungen, wie sie bei freiem DOX zu beobachten sind. Da bei Zimmermann die maximal tolerierbare Dosis noch nicht erreicht wurde, erhöhte Troedson in einer weiteren Dosisfindungsstudie die Dosis des DPPG₂-TSL-DOX auf bis zu 1,0 mg/kg (ZIMMERMANN 2014, TROEDSON 2015). Eine Reduktion des Tumolvolumens bei vertretbaren Nebenwirkungen konnte bei der Dosisgruppe ab einer Dosierung von 0,8 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX verzeichnet werden (TROEDSON 2015). Gegenstand dieser Studie ist es, die Effektivität und Toxizität der Kombinationstherapie aus freiem DOX in einer Dosierung von 1,0 mg/kg und einer RHT im Vergleich zu der Therapie mit DPPG₂-TSL-DOX in einer Dosierung von 1,0 mg/kg und einer RHT bei der Behandlung inoperabler Fibrosarkome der Katze zu evaluieren.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das Fibrosarkom bei der Katze

1.1. Hintergrundinformationen

Das feline Fibrosarkom ist ein maligner Tumor mesenchymalen Ursprungs, der durch ein schnelles Wachstum mit einer Metastasierungsneigung von 10 % bis 28 % gekennzeichnet ist (HERSHEY et al. 2000, MACY und GUILLERMO COUTO 2001, MARTANO et al. 2011). FISS verhält sich lokal invasiv und neigt zur Bildung von Ausläufern, die bei der Palpation übersehen werden können. Die Ausläufer können mehrere Zentimeter in die Tiefe wachsen und die Muskulatur und Knochen infiltrieren. Die häufigste Metastasierungslokalisation des FISS ist die Lunge, es können aber auch Metastasen im subkutanen Gewebe, der Leber und den regionalen Lymphknoten auftreten (LADLOW 2013). In der Literatur wird die Inzidenz von FISS mit 0,63/10.000 und 3,6/10.000 Katzen beschrieben (KASS et al. 1993, COYNE et al. 1997, GOBAR und KASS 2002). Im Jahr 2000 wurden von Kessler in Deutschland 1.500 feline impfassoziierte Fibrosarkome bestimmt, das annähernd einer Inzidenz von 1/1.000 Katzen entspricht (KESSLER 2005). Eine Rasse- und Geschlechtsprädisposition liegt nicht vor. KASS et al. beschrieben 1993, dass Katzen, die Tumoren an typischen Impflokalisationen zeigen, eine bimodale Altersverteilung von 6 Jahren bis 7 Jahren und von 10 Jahren bis 11 Jahren haben und jünger sind als Katzen mit Tumoren an anderen Körperstellen. Es wurde ein Zusammenhang zwischen einer Impfung gegen das feline Leukämie-Virus (FeLV) und Tollwut und der Tumorentstehung hergestellt. Das Risiko steigt mit der an der gleichen Stelle verabreichten Impfungen und war bei einer Impfung im Vergleich zu Katzen, die keine Impfung erhielten, um 50 %, bei zwei Impfungen um 127 % und bei drei bis vier Impfungen um 175 % höher (KASS et al. 1993).

Zwischen 1987 und 1991 war eine Zunahme des Auftretens von histopathologisch diagnostizierten feline Fibrosarkomen in typischen Impflokalisationen zu beobachten. Die Inzidenz für Fibrosarkome in den Lokalisationen, in denen keine Impfung erfolgt ist, ist in diesem Zeitraum nicht angestiegen. Aufgrund der Assoziation zwischen der neuen Impfeempfehlung für Katzen, vor allem für die Tollwutimpfung, und der erhöhten Inzidenz von feline Fibrosarkomen wurde der Terminus „impfassoziiertes Fibrosarkom“ eingeführt (HENDRICK und

GOLDSCHMIDT 1991). In den Makrophagen des Tumorgewebes wurde beispielsweise grau-braunes Material gefunden, das man als Aluminium identifizierte und welches in Zusammenhang mit vorangegangenen Tollwutimpfungen gebracht wurde. Auch die Impfung gegen FeLV wurde mit einer Tumorentstehung assoziiert. Folglich wurden für die Tumorentstehung Vakzine und deren Adjuvantien vermutet (HENDRICK und GOLDSCHMIDT 1991, HENDRICK et al. 1992, MACY und GUILLERMO COUTO 2001, MARTANO et al. 2011). Die Bezeichnung des felines Fibrosarkoms als „impfassoziert“ wurde durch den Terminus „felines injektionsassoziertes Fibrosarkom“ (FISS) abgelöst, da in Studien herausgefunden wurde, dass neben den Impfungen auch jede andere Injektion von Fremdmaterial, die eine chronische lokale Entzündungsreaktion in der Muskulatur oder dem subkutanen Gewebe hervorruft, bei prädisponierten Katzen zu einer tumorösen Entartung des Gewebes führen kann. Die Hypothese ist, dass die Entzündungsreaktion zu einer unkontrollierten Fibroblasten- und Myofibroblasten-Proliferation führt, die einer malignen Transformation unterzogen werden (MCENTEE und PAGE 2001). Diese tumoröse Entartung kann auch erst drei bis zehn Jahre später auftreten (MCENTEE und PAGE 2001, SÉGUIN 2002). Als Auslöser für die chronische Entzündungsreaktion wurde unter anderem nicht resorbierbares Nahtmaterial und Mikrochips sowie Depot-Kortison und Depot-Antibiotika identifiziert (MCENTEE und PAGE 2001, SÉGUIN 2002, KASS et al. 2003, DALY et al. 2008, CARMINATO et al. 2011, SRIVASTAV ET AL. 2012).

1.2. Diagnostik

Die histologische Untersuchung stellt gegenüber der zytologischen Untersuchung eines Feinnadelaspirates ein besseres diagnostisches Mittel dar, da eine zytologische Diagnose nur in 50 % der Fälle gestellt werden kann. Für die histologische Untersuchung wird eine Inzisionsbiopsie einer True-cut-Biopsie vorgezogen, da der Tumor heterogen sein kann und bei einer kleinen Probe als Granulom fehldiagnostiziert werden könnte. Die Lokalisation der Gewebeprobeentnahme sollte so gewählt werden, dass der Bereich leicht entfernt werden kann und sich das spätere Operationsfeld nicht vergrößert (MARTANO et al. 2011).

1.3. Therapie

Bei der Behandlung des FISS wird eine multimodale Therapie empfohlen (MARTANO et al. 2011). Aufgrund der Fähigkeit der Fibrosarkome zur Ausbildung einer Pseudokapsel kann das Ausmaß des Tumors beim Abtasten unterschätzt werden. Daher empfiehlt sich eine CT-Untersuchung oder eine MRT-Untersuchung, um die Ausdehnung des Tumors vor der Therapie zu evaluieren. Es ist nicht belegt, dass dies die Überlebenszeit verbessert, jedoch machte es aufgrund der guten Kontrastmittelanreicherung beim FISS eine Operationsplanung leichter (MCENTEE und PAGE 2001, LADLOW 2013). Die weiträumige Exzision des Tumors, als Grundstein der Therapie, zum makroskopisch gesunden Gewebe wird mit drei bis fünf Zentimetern Sicherheitsabstand empfohlen. Außerdem sollte mindestens eine Faszien-Schicht unter dem Tumor entfernt werden (MARTANO et al. 2011, PHELPS et al. 2011). Eine radikale Exzision des Tumors beinhaltet unter anderem eine Amputation der Dornfortsätze, eine partielle oder vollständige Schulterblatt- sowie Rippenentfernung und die Amputation von Gliedmaßen (MARTANO et al. 2011, PHELPS et al. 2011). Hierbei werden Rezidivraten von 45 % bis 70 % beschrieben, meist kommt es zu einem erneuten Wachstum innerhalb der ersten 6 Monate nach der Operation (HENDRICK et al. 1994, DAVIDSON et al. 1997, CRONIN et al. 1998). Die Rezidivrate kann bei einer histologisch vollständigen Tumorentfernung bei 14 % bis 50 % liegen (MCENTEE und PAGE 2001, PHELPS et al. 2011). Davidson et al. zeigten 1997 mit median 16 Monaten bei Katzen mit einer histologisch vollständigen Exzision gegenüber vier Monaten bei Katzen mit inkomplett entfernten Tumoren eine signifikant längere krankheitsfreie Zeit. Die Überlebenszeit war mit median 16 Monaten mit einer kompletten Entfernung ebenfalls signifikant länger als bei einer unvollständigen Entfernung mit neun Monaten (DAVIDSON et al. 1997). In einer Studie von 2010 wurde eine Rezidiv-Bildung bei histologisch komplett im Gesunden entfernten Tumoren bei 19 % der Patienten beschrieben und bei inkomplett entfernten Tumoren lag diese bei 69 % (GIUDICE et al. 2010). Müller und Kessler dokumentierten bei Katzen mit FISS, die mit einer standardisierten radikalen Operationstechnik durch einen Chirurgen behandelt wurden, ein lokales Tumorrezidiv bei 38,1 % der Katzen. Patienten, bei denen ein Rezidiv operiert wurde, hatten ein signifikant höheres Risiko für ein weiteres Rezidiv als Katzen, bei denen ein Primärtumor operiert wurde (55,5 % gegenüber 33,3 %) (MÜLLER und KESSLER 2018).

Um die lokale Tumorkontrolle zu verbessern, wird auf eine prä- oder postoperative Strahlen- und Chemotherapie zurückgegriffen. Cronin et al. beschrieben in einer Studie von 1998 bei 33 Katzen mit einer histologisch gestellten Diagnose eines Fibrosarkoms eine mediane krankheitsfreie Zeit von 398 Tagen bei einer präoperativen Strahlentherapie sowie eine mediane Überlebenszeit von 600 Tagen (CRONIN et al. 1998). In einer weiteren Studie mit 92 Katzen von 2002 zeigte sich durch eine präoperative Strahlentherapie eine verlängerte krankheitsfreie Zeit, wobei diese bei vollständig entfernten Tumoren mit median 986 Tagen höher lag als bei den inkomplett resezierten Tumoren mit median 292 Tagen (KOBAYASHI et al. 2002). Eckstein et al. beschrieben eine krankheitsfreie Zeit bei einer postoperativen kurativen Strahlentherapie mit median 37 Monaten. Einige Katzen mit einer makroskopischen Erkrankung erhielten außerdem eine Chemotherapie und zeigten eine höhere mediane Überlebenszeit als Katzen mit einer makroskopischen Erkrankung ohne Chemotherapie (29 Monate vs. 5 Monate) (ECKSTEIN et al. 2009). Viele der klinischen Studien über die Anwendung einer Chemotherapie sind retrospektiv und nutzen verschiedene Kombinationstherapien, daher ist es schwierig den zusätzlichen Nutzen genau zu bestimmen (LADLOW 2013). Zelllinien des injektionsassoziierten Fibrosarkoms zeigen *in vitro* eine Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika wie Mitoxantron und DOX (WILLIAMS et al. 2001). Cohen et al. kombinierten DOX und Cyclophosphamid mit einer Operation und postoperativen Strahlentherapie. Die Rezidiv- und Metastasierungsrate sowie die Überlebenszeit der Katzen unterschieden sich nicht signifikant von den Katzen, die keine Chemotherapie erhalten haben (COHEN et al. 2001). Poirier et al. berichteten eine verlängerte mediane krankheitsfreie Zeit mit 388 Tagen bei Katzen, die eine chirurgische Exzision des Tumors in Kombination mit einer Chemotherapie erhielten gegenüber Katzen, die mit einer alleinigen Operation therapiert wurden (388 Tage vs. 93 Tage). Die Metastasierungsrate war mit 5,6 % beschrieben (POIRIER et al. 2002). In einer weiteren Studie mit 69 Katzen konnte kein signifikanter Unterschied in der Rezidiv- und Metastasierungsrate sowie krankheitsfreien Zeit und Überlebensrate bei der Therapiegruppe mit einer alleinigen Chirurgie und der Therapiegruppe, die mit einer chirurgischen Exzision und Chemotherapie behandelt wurde, festgestellt werden (MARTANO et al. 2005). Hahn et al. verglichen bei 71 Katzen mit inkomplett resezierten Fibrosarkomen eine alleinige Strahlentherapie mit einer Kombinationsbehandlung aus einer Strahlentherapie und Chemotherapie. Es

konnte kein bedeutender Unterschied in der medianen Überlebenszeit beider Therapiegruppen festgestellt werden, jedoch war die krankheitsfreie Zeit bei der Kombinationstherapie mit median 15,4 Monaten signifikant länger als bei der Monotherapie mit median 5,7 Monaten (HAHN et al. 2007).

2. Doxorubicin

DOX aus der Wirkstoffgruppe der Anthrazykline gehört zu den antibiotischen Zytostatika. Es wird üblicherweise zur Behandlung einer Reihe von lymphatischen Tumoren und Karzinomen sowie Sarkomen bei der Katze eingesetzt (KENT 2013). Zu den systemischen Nebenwirkungen, die bei der Katze beschrieben sind, gehören gastrointestinale Symptome wie Anorexie, Übelkeit und ein daraus resultierender Gewichtsverlust. Eine Neutropenie ist vor allem ausschlaggebend für eine Dosislimitation, aber auch Thrombozytopenien sind als myelosuppressive Nebenwirkung zu beobachten. Nebenwirkungen bei der Katze wie Anämien und Niereninsuffizienzen können bei einer kumulativen Dosis des DOX, also meist erst nach mehrfachen Anwendungen, von 180 bis 240 mg/m² auftreten (MAULDIN et al. 1988, O'KEEFE et al. 1993, POIRIER et al. 2002, KENT 2013). Im Gegensatz zu Hund und Mensch wurde bei der Katze bisher keine kumulative Kardiotoxizität beobachtet. Die maximal tolerierbare Dosis von freiem DOX beträgt bei der Katze 1,0 mg/kg.

3. Pharmakokinetik von freiem DOX

Freies DOX hat ein hohes Verteilungsvolumen, so dass es sich schnell bei der intravenösen Applikation aus dem zentralen Kompartiment, dem Plasma, in die verschiedenen Gewebekompartimente umverteilt. Dies lässt sich mit einem Zwei-Kompartiment-Modell analysieren (ALLEN 2007). Durch die schnelle Eliminierung des Wirkstoffes über die Nieren kommt es zu einem logarithmisch-linearen Abfall der DOX-Plasmakonzentration. Hierdurch entsteht eine niedrige Halbwertszeit t_{α} , eine hohe Rate der Clearance und eine niedrige Fläche der AUC (Area under the curve). Eine zweite verlängerte Eliminationshalbwertszeit t_{β} zeigt sich, da durch die entstehende erniedrigte DOX-Konzentration im Plasma das DOX entlang seines Konzentrationsgradienten vom Gewebe zurück ins Plasma diffundiert. Es erfolgt daraufhin eine erneute Elimination aus dem Blutplasma (ALLEN 2007).

4. Liposomen

4.1. Entstehung der Liposomen

Bangham et al. beschrieben 1965 erstmals, dass Phospholipide in wässrigen Systemen geschlossene zweischichtige Strukturen bilden können (BANGHAM et al. 1965). Diese synthetisch gebildeten, biokompatiblen und bioabbaubaren Liposomen bestehen aus einer Lipid-Doppelschicht, welche ein wässriges Kompartiment einschließt. Sie können entweder in dem wässrigen Kompartiment mit hydrophilen Arzneimitteln oder in der wasserunlöslichen Doppelschichtmembran mit hydrophoben Wirkstoffen beladen und so als Nanocarrier eingesetzt werden (TORCHILIN 2005, KNEIDL et al. 2014). Liposomen sollen im Rahmen der Tumorforschung die biologische Verteilung der traditionellen Chemotherapeutika verbessern, deren systemische Toxizität verringern und die Anreicherung im Tumor begünstigen (TORCHILIN 2005, MINCHINTON und TANNOCK 2006, LANDON et al. 2011). Die klassischen Liposomen wurden jedoch zügig über die Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) eliminiert (POSTE et al. 1982, GULATI et al. 1998, LINDNER und ISSELS 2003). Im Jahr 1991 erfolgte der Einsatz einer PEGylierung, wodurch die Zirkulationszeit der Liposomen verlängert werden konnte. Hierbei handelt es sich um eine kovalente Bindung von Methoxypolyethylenglykol (PEG) an die Liposomen-Oberfläche, wodurch die Erkennung der Liposomen durch Serumproteine wie Opsonine und die anschließende Eliminierung verlangsamt wird (PAPAHADJOPOULOS et al. 1991). Die erste zugelassene liposomale Formulierung für DOX, das in PEGylierten liposomalen Nanocarriern eingeschlossen wurde, war Doxil® (registriert in Europa als Caelyx®). Es zeigte sich in Studien im Vergleich zu freiem DOX ein verbessertes Nebenwirkungsprofil, jedoch keine verbesserte Wirksamkeit (JUDSON et al. 2001, POIRIER et al. 2002, LANDON et al. 2011). Matteucci et al. führten eine Studie über Technetium-99m-markierte Liposomen bei Katzenfibrosarkomen in Kombination mit einer Hyperthermie zur Evaluierung des Effektes der Hyperthermie auf die Akkumulation der Liposomen im Tumor durch und zeigte eine gesteigerte Akkumulation unter hyperthermischen im Vergleich zu normalen thermischen Bedingungen (MATTEUCCI et al. 2000). Poirier et al. stellten keinen signifikanten Unterschied in der Effektivität zwischen der Therapie mit liposomal-eingeschlossenem DOX (Doxil®) und freiem DOX bei Katzen fest. In dieser Studie

wurden infolge der Applikation des liposomalen DOX Anaphylaxie-ähnliche Reaktionen und eine Azotämie festgestellt, weshalb die Dosis reduziert werden musste (POIRIER et al. 2002). In einer weiteren Studie von Kleiter et al. wurde in einem Rattenfibrosarkom-Modell die Verwendung eines radioaktiv markierten Tracers zur Abschätzung der intratumoralen Doxil[®]-Extravasation unter hyperthermischen und normothermen Bedingungen untersucht. Es wurde eine erhöhte DOX-Konzentration sowie Radioaktivität im Tumorbereich bei der Hyperthermie im Vergleich zu der nicht erhitzten Kontrolle beobachtet (KLEITER et al. 2006). Kleiter et al. untersuchten 2010 die Therapie von nicht-thermosensitiven Liposomen mit DOX (Caelyx[®]) kombiniert mit einer palliativen Strahlentherapie bei lokal fortgeschrittenen Fibrosarkomen der Katze. Es wurde eine erhöhte Strahlensensibilität beobachtet. Die progressionsfreie Zeit betrug bei diesem palliativen Ansatz median 117 Tage und die Ansprechrate lag bei 70 % (KLEITER et al. 2010).

Die PEGylierung wird inzwischen in der Literatur kontrovers diskutiert. PEG ist sowohl immunogen als auch antigen und es kann zur Bildung von Anti-PEG-Antikörpern kommen. Solche Antikörper wurden auch bei Personen, die nicht mit PEG-Medikamenten behandelt wurden, nachgewiesen, was auf eine Exposition mit PEG-haltigen Verbindungen in Kosmetika, Arzneimitteln und verarbeiteten Lebensmitteln zurückzuführen ist (GARAY et al. 2012). Es kann eine Immunantwort ausgelöst werden, die zu einer beschleunigten Blutausscheidung der PEGylierten Nanoträger führt, dem sogenannten ABC-Phänomen (Accelerated Blood Clearance). Dieses Phänomen wurde bei PEG-konjugierten Substanzen und PEGylierten Nanoträgern beobachtet, die innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls nach der ersten Dosis erneut appliziert wurden, was zu einer beschleunigten Blutausscheidung und verminderten Wirksamkeit führte (ABU LILA et al. 2013). Ishida et al. beobachteten dieses Phänomen in Ratten und Mäusen (ISHIDA et al. 2003a, ISHIDA et al. 2003b). Auch pseudoallergische Reaktionen, bei denen vermutet wird, dass sie durch eine Komplementaktivierung ausgelöst werden (complement activation-related pseudoallergy, CARPA), werden mit Anti-PEG-Antikörpern in Verbindung gebracht (KOZMA et al. 2020, ESTAPÉ SENTI et al. 2022).

Laginha et al. untersuchten die Bioverfügbarkeit von freiem DOX und liposomalen DOX-Formulierungen in Tumoren. Bei freiem DOX wurde eine Bioverfügbarkeit

von 95 % beobachtet, 95 % der DOX-Konzentration, die im Tumor gemessen wurde, war nach 24 Stunden an die DNA der Zellkerne gebunden. Bei Doxil® waren 49 % des liposomalen DOX und bei liposomalen Formulierungen mit einer schnelleren DOX-Freisetzungsrate gegenüber Doxil® 27 % bioverfügbar. Die AUC von Doxil® war für das gesamte DOX sieben Tage nach der Injektion 87-fach höher als die für freies DOX (LAGINHA et al. 2005). Eine mögliche Erklärung für die begrenzte Bioverfügbarkeit des Chemotherapeutikums ist die Stabilität des Liposoms. Zudem erfolgt die Wirkstofffreisetzung langsam über eine passive Extravasation der sogenannten Stealth-Liposomen aus den Tumorblutgefäßen (LANDON et al. 2011). Die passive Extravasation der Liposomen wird als EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect) bezeichnet. Dieser Effekt beruht auf einer extensiven Angiogenese, die mit einer Hypervaskularisierung verbunden ist, vergrößerten Endothelporen, einer diskontinuierlichen Basalmembran, einem gestörten Lymphdrainagesystem, was zu einer verlängerten Verweildauer der Liposomen im Tumorinterstitium beiträgt sowie einer erhöhten Produktion einer Reihe von Permeabilitätsmediatoren bei soliden Tumoren im Vergleich zu normalem Gewebe (MAEDA et al. 2000, LANDON et al. 2011, MAEDA et al. 2013). Das gesamte Liposom wird von der Zelle aufgenommen und ist überwiegend in den Lysosomen lokalisiert, was auf die Beteiligung eines endozytotischen Transportweges schließen lässt, und wird dort abgebaut. Das DOX kann von den Lysosomen nicht in den Zellkern gelangen, da der geringe pH-Wert das DOX membranundurchlässig macht. Außerdem ist es möglich, dass die Stabilität des Doxil® den Austritt des DOX verhindert, auch wenn es in den Lysosomen vorliegt (SEYNHAEVE et al. 2007, SEYNHAEVE et al. 2013).

Die Abgabe von Arzneimitteln durch den EPR-Effekt ist jedoch begrenzt und wird durch Faktoren, wie beispielsweise die Beschaffenheit des Gefäßbettes und umgebenden Stromas, das Vorhandensein oder Fehlen von Lymphgefäßen, die interstitielle hydraulische Leitfähigkeit, die mechanische Belastung, ausgelöst durch Tumor- und Stromazellen, die Größe, Art und Lage des Tumors sowie das Ausmaß der Makrophagen-Infiltration des Tumors und die Aktivität des mononukleären Phagozytose-Systems beeinflusst (PRABHAKAR et al. 2013). Dies sorgt für eine weniger als zweifach höhere Abgabe von Nanopartikeln im Vergleich zu normalem Gewebe, was für das Erlangen therapeutischer Konzentrationen im Tumor in der Regel nicht ausreicht, obwohl die

Nebenwirkungen im gesunden Gewebe aufgrund der geringeren Anreicherung generell reduziert werden (NAKAMURA et al. 2016). Durch verschiedene Parameter kann der EPR-Effekt verstärkt werden, hierzu zählt auch eine Erhöhung der Durchlässigkeit von Tumorblutgefäßen durch beispielsweise eine Hyperthermie (NAKAMURA et al. 2016). Trotz der Steigerung der Akkumulation liposomaler Wirkstoffe im Tumorgewebe durch Hyperthermie sind PEGylierte Liposomen so konzipiert, dass sie ihren Wirkstoff einschließen und nur langsam freigeben. Der ideale Wirkstoffträger sollte aber nicht nur stabil in der Blutzirkulation sein, sondern auch einen Auslöser besitzen, der die vollständige und schnelle Freisetzung des Wirkstoffes im Tumor ermöglicht. Also ein Wirkstoffträger, der auf externe Stimuli wie zum Beispiel Hitze reagiert (LANDON et al. 2011, MURA et al. 2013).

1978 entwickelten Yatvin et al. eine erste Formulierung für TSL basierend auf Dipalmitoylphosphatidylcholin und Distearoylphosphatidylcholin, die wärmeinduziert Neomycin freisetzen und die Proteinsynthese *in vitro* von *Escherichia coli* hemmen. Die T_m lag mit 43 °C bis 45 °C sehr hoch (YATVIN et al. 1978). Eine Wirkstofffreisetzung bei milden hyperthermischen Bedingungen mit einer klinisch erreichbaren T_m von 40 °C bis 42 °C wird heute für TSL-Formulierungen bevorzugt (KNEIDL et al. 2014). Zudem wurde bei den ersten Formulierungen der Wirkstoff nur langsam freigesetzt (rund 40 % über 30 Minuten) und die Liposomen wurden zügig von den Zellen des RES eliminiert. Mit der Erfindung der low-thermosensitive Liposomen-Formulierung (LTSL), in denen Lysolipide in die Doppelschicht eingebaut wurden, was die T_m herabsetzt, konnte die Freisetzung beschleunigt werden. LTSL setzten ihren Inhalt bei einer Hyperthermie im Bereich von 40 °C bis 42 °C (zu 45 % innerhalb von 20 s nach einer Exposition mit 42 °C) zügig frei. Durch die Verwendung von PEG-Lipiden verlängerte sich auch die Zirkulation im Blut (ANYARAMBHATLA und NEEDHAM 1999, KONG und DEWHIRST 1999, KONG et al. 2000a, NEEDHAM et al. 2000, LANDON et al. 2011). Die erste hitzeaktivierte Formulierung, die in klinischen Studien am Menschen eingesetzt wurde, war Lyso-thermosensitives liposomales DOX (LTLD, ThermoDOX®). Die Entwicklung von LTLD basierte auf vier Gestaltungsprinzipien (zurückhalten, umgehen, anvisieren und freisetzen). Der Träger sollte so konzipiert sein, dass das ungewollte Austreten des eingeschlossenen Wirkstoffes bei der systemischen Applikation an einem Patienten

verhindert oder minimiert, die Formulierung von dem RES nicht erkannt (PEGylierung) und das Liposom durch beispielsweise eine Erhitzung des Zielvolumens zum gewünschten Ort gebracht und der Inhalt freigesetzt wird (BORYS und DEWHIRST 2021). In einer Phase-III-Studie, der HEAT-Studie (NCT00617981) sollte der Nutzen von ThermoDOX[®] als Zusatztherapie zu einer Radiofrequenzablation im Vergleich zu einer alleinigen Radiofrequenzablation bei humanen hepatozellulären Karzinomen untersucht werden. Die Studie hatte ihren primären Endpunkt hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens nicht erreicht. Eine Untergruppenanalyse zeigte jedoch eine deutliche Verbesserung des progressionsfreien Überlebens und eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens, wenn die Radiofrequenzablation nach der ThermoDOX[®]-Infusion für mehr als 45 Minuten durchgeführt wurde (DOU et al. 2017). Dou et al. diskutierten im Jahr 2017 die möglichen Gründe für das Scheitern (DOU et al. 2017). Eine weitere klinische Phase-III-Studie, die OPTIMA-Studie (NCT02112656), unterschied sich von der HEAT-Studie in einem standardisierten Erhitzungsprotokoll mit einer 45-minütigen Erhitzungszeit bei der Radiofrequenzablation (REGENOLD et al. 2022). Diese Studie wurde ebenfalls wegen Erfolglosigkeit abgebrochen. Die möglichen Einschränkungen der ThermoDox[®]-Studien wurden im Jahr 2022 von Regenold et al. diskutiert (REGENOLD et al. 2022).

Lindner et al. entwickelten eine thermosensitive liposomale Formulierung unter Verwendung des synthetischen DPPG₂ mit einer Struktur und einem Molekulargewicht ähnlich dem natürlichen 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) (LINDNER et al. 2004). Bei dieser Formulierung wurde keine PEGylierung genutzt. DPPG₂-TSL zeigte eine erhöhte Plasmahalbwertszeit bei einer gleich schnellen Freisetzungsrate von DOX bei 42 °C sowie eine bessere Stabilität über die Zeit in Anwesenheit von Serum bei 37 °C im Vergleich zu LTSL, bei denen durch die Nutzung von Lysolipiden und 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-polyethylene Glycol 2000 (DSPE-PEG2000) die Dispersionsstabilität bei 37 °C beeinträchtigt ist (HOSSANN et al. 2007, HOSSANN et al. 2012, HOSSANN et al. 2021).

4.2. Wirkstofffreisetzung aus den Liposomen

Bei den PEGylierten, mit DOX beladenen Liposomen erfolgt die Anreicherung im Tumorgewebe über den EPR-Effekt. Aufgrund der Hyperpermeabilität der

Tumorgefäße erfolgt eine passive Extravasation der Liposomen in das Tumoringterstitium (MAEDA et al. 2000, LANDON et al. 2011, MAEDA et al. 2013). Das Endothel kann Porengrößen mit einem Durchmesser von bis zu 800 nm haben, wodurch eine Extravasation von Liposomen mit einem Durchmesser von etwa 100 nm bis 200 nm ermöglicht werden kann. Durch die lange Zirkulation im Blut haben die PEGylierten Liposomen mehr Möglichkeiten, sich im Tumorgewebe anzureichern und verweilen dort aufgrund des gestörten Lymphdrainagesystems länger (ISHIDA et al. 1999, LAGINHA et al. 2005, MAEDA et al. 2013).

Kong et al. zeigten 2000 anhand eines menschlichen Tumors, der in einem Fensterkammermodell an der Maus gezüchtet wurde, dass durch eine Hyperthermie die Extravasation von Liposomen unterschiedlicher Größen ermöglicht wird (KONG et al. 2000b). Bei Liposomen mit einer Vesikelgröße von 100 nm war die höchste Extravasation unter Hyperthermie zu beobachten. Die Hyperthermie ermöglichte keine Extravasation von Liposomen in der Größe von 100 nm aus dem normalen Gefäßsystem (KONG et al. 2000b). Kong et al. untersuchten zudem die DOX-Konzentration im Tumorgewebe mittels Immunfluoreszenz bei verschiedenen mit DOX beladenen liposomalen Formulierungen sowie freiem DOX in Kombination mit einer Hyperthermie. Alle drei Formulierungen erreichten bei 42 °C höhere DOX-Konzentrationen als bei 34 °C. Während das freie DOX nach der einstündigen Hyperthermie nahezu nicht mehr nachgewiesen werden konnte, war die Wirkstoffkonzentration im Tumorgewebe bei den LTSL 20- bis 30-mal so hoch wie bei freiem DOX und 5-mal so hoch wie bei einer Doxil[®]-ähnlichen Formulierung. Die LTSL zeigten auch als Einzige in Kombination mit der Hyperthermie eine signifikante Menge an DNA-gebundenem DOX. Die hohe DOX-Konzentration der LTSL, die erreicht werden konnte, lässt sich mit der Kombination aus einer interstitiellen und intravaskulären Freisetzung erklären (KONG et al. 2000a).

Unter normothermen Bedingungen bleibt der Wirkstoff in den TSL eingeschlossen, da sich die Liposomen-Membran in einer festen Gel-Phase mit einer hohen Packungsdichte und Ordnung befindet. Die Durchlässigkeit für hydrophile Substanzen ist hierbei gering (LINDNER und HOSSANN 2010). Oberhalb der T_m geht die Membran in einen flüssigen, ungeordneten Zustand über, der eine höhere Permeabilität für hydrophile Wirkstoffe aufweist. Die Permeabilität ist um die T_m herum am höchsten, da Membranbereiche in beiden Phasen koexistieren

(LANDON et al. 2011, KNEIDL et al. 2014). Das Freisetzungsprofil von hydrophilen Wirkstoffen aus TSL kann durch die Phospholipid-Zusammensetzung und durch eine Größenanpassung der TSL verändert werden (LINDNER et al. 2004, HOSSANN et al. 2007, HOSSANN et al. 2010). Hossann et al. untersuchten 2012 den Einfluss von Serumkomponenten auf vier TSL-Formulierungen und identifizierten hochmolekulare Serumkomponenten als Ursache für eine erhöhte Wirkstofffreisetzung aus allen getesteten Formulierungen. Albumin führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Wirkstofffreisetzung, der bei Temperaturen um und über der T_m nachweisbar war. Bei Temperaturen unterhalb der T_m stabilisierte das Protein die Membrandoppelschicht. Auch die Präsenz von cholesterinhaltigen Lipid-Vesikeln erhöhte die Membranpermeabilität der untersuchten TSL konzentrationsabhängig bei Temperaturen um und über der T_m (HOSSANN et al. 2012). Manzoor et al. zeigten anhand eines Fensterkammer-Modells an der Maus und anhand von histologischen Analysen in Maustumoren, dass DOX aus LTSL im Vergleich zu freiem DOX und Doxil[®] tiefer in den Tumor eindringt. Trotz Hyperthermie war die maximale Penetration von Doxil[®] auf 34 mm begrenzt. Eine intravaskuläre Freisetzung von DOX hat höhere Wirkstoffkonzentrationen in den Tumorblutgefäßen zur Folge, wodurch ein Konzentrationsgradient von den Gefäßen in das Gewebe entsteht. So kann das DOX von den Gefäßen tiefer in das Tumorgewebe diffundieren (MANZOOR et al. 2012).

4.3. Toxizität der Liposomen

4.3.1. Lokale Toxizität

In einer Studie von Poirier et al., in der die Effektivität und Toxizität von liposomal eingeschlossenem DOX (Doxil[®]) und freiem DOX bestimmt wurde, zeigten 22 % der Katzen mit liposomalem DOX unterschiedliche Hautreaktionen in Form von Erythemen, Hyperpigmentation, Alopezie und Papel-Bildung. Die Läsionen traten gegen Ende des Protokolls nach mehrfacher Applikation auf und waren hauptsächlich perioral und an den hinteren Gliedmaßen lokalisiert. Es wurden bei den Katzen weder Schmerzen, Ödeme noch Juckreiz oder Geschwüre festgestellt. Es waren keine Behandlungsverzögerungen oder Dosisreduktionen notwendig. Die Reaktionen verschlimmerten sich auch nicht offensichtlich nach der Weiterführung der Behandlung (POIRIER et al. 2002). In einer Phase-I-Studie von Hauck et al. wurde die Toxizität sowie die Pharmakokinetik und die maximal tolerierte Dosis

von in LTSL eingeschlossenem DOX beim Hund bestimmt. Die maximal tolerierte Dosis betrug 0,93 mg/kg und lag somit unterhalb der von freiem DOX. In dieser Studie wurde eine Hautreaktion beim Hund festgestellt, wie sie auch beim Menschen auftreten kann (HAUCK et al. 2006). Bei der Anwendung von liposomalem DOX beim Menschen kann es an Hautbereichen, die stärker beansprucht werden und häufig Druck oder Mikrotraumen ausgesetzt sind, wie Hände und Füße, zu einer palmar-plantaren Erythrodyssäthese, dem sogenannten Hand-Fuß-Syndrom, kommen. Es wird vermutet, dass durch die verlängert zirkulierenden Wirkstoffspiegel bei einem kontinuierlichen Regime eine Wirkstoffakkumulation in der Haut ermöglicht wird (GORDON et al. 1995, LYASS et al. 2000). Der genaue Mechanismus der durch PEGyliertes liposomales DOX induzierten palmar-plantaren Erythrodyssäthese ist noch unklar. Zur Prävention werden regionale Kühlung und Plasmafiltration genutzt. Pyridoxin wird oft zur Prophylaxe und Behandlung eingesetzt. Änderungen in der Dosis und des Verabreichungsintervalls oder eine Kombination mit anderen Chemotherapeutika wie Platinverbindungen kann das Auftreten einer medikamentenbedingten Toxizität minimieren sowie die Wirksamkeit optimieren (ZHU et al. 2020).

4.3.2. Systemische Toxizität

Der Einschluss von Chemotherapeutika in Nanocarriern wie TSL soll das Nebenwirkungsprofil der Wirkstoffe verbessern, indem der Wirkstoff gezielt in der durch Hyperthermie erwärmten Region freigesetzt und gesundes Gewebe dem Wirkstoff nur minimal ausgesetzt wird (LINDNER und HOSSANN 2010, LANDON et al. 2011). Es kann jedoch ein Hypersensitivitätssyndrom auftreten, hauptsächlich bedingt durch eine Komplementaktivierung infolge der Erkennung der Liposomen durch das Immunsystem, das als CARPA bezeichnet wird. Diese Überempfindlichkeitsreaktionen sind meist mild und vorübergehend und können mit gewissen Maßnahmen verhindert werden, jedoch können sie bei einzelnen Patienten auch schwerwiegend verlaufen oder sogar tödlich enden (SZEKENI et al. 2011). CAPRA manifestiert sich hauptsächlich im Respirationstrakt und Herzkreislaufsystem, aber auch neuropsychosomatische Symptome und Symptome der Schleimhaut, Haut sowie des autonomen Nervensystems sind beschrieben. Häufige Symptome sind Rötung, Hautausschlag, Dyspnoe, Brust- und Rückenschmerzen sowie subjektives Unwohlsein. Die Symptome treten in der Regel bei der ersten Behandlung auf, können aber in seltenen Fällen auch erst nach

der zweiten oder dritten Behandlung in Erscheinung treten, was mit einer größeren Menge an Prämedikationen und einer langsamen Verabreichung des Medikamentes im ersten Zyklus erklärt werden kann (SZE BENI et al. 2011). FÜLÖP et al. zeigten in einem Schweinemodell, dass die Überempfindlichkeitsreaktion durch eine Verringerung der Infusionsgeschwindigkeit und eine Verlängerung der Infusionsdauer des Arzneimittels deutlich reduziert oder vermieden werden kann (FÜLÖP et al. 2019). In zwei Studien wurden Hunde und Katzen mit liposomalem DOX therapiert und anaphylaktoide Reaktionen beobachtet, die eine Behandlung mit Steroiden und Antihistaminika notwendig machten (POIRIER et al. 2002, HAUCK et al. 2006). In der Phase-I-Studie von Hauck et al. wurden Hunde mit soliden Tumoren unterschiedlicher Genese mit DOX-LTSL und einer lokalen Hyperthermie behandelt und in der Studie von Poirier et al. erfolgte die Anwendung von liposomalem DOX (Doxil®) bei Katzen mit Vakzin-assoziierten Sarkomen (POIRIER et al. 2002, HAUCK et al. 2006). Hauck et al. beobachteten außerdem eine Nierentoxizität, die wahrscheinlich auf eine verminderte Nierenperfusion infolge der Histaminfreisetzung zurückzuführen war. Die Empfindlichkeit von Hunden gegenüber liposomalem DOX kann einen relevanten Abfall des arteriellen Blutdruckes verursachen, was zu Nierenschäden führt und eine Prämedikation notwendig macht (HAUCK et al. 2006). In zwei Phase-I-Studien zur Dosisescalation/Pharmakokinetik von LTSL mit einer milden lokalen Hyperthermie bei Frauen mit lokalem, wiederkehrendem und vorbehandeltem Brustkrebs war keine Nierentoxizität zu beobachten. Die Patientinnen erhielten eine Prämedikation mit Dexamethason, Diphenhydramin und Antazidum (ZAGAR et al. 2014). Kleiter et al. untersuchten die Durchführbarkeit einer palliativen Kombinationstherapie aus Strahlentherapie und liposomalem DOX (Doxil®) bei zehn Katzen mit fortgeschrittenen Fibrosarkomen. In dieser Studie konnten keine akuten Anaphylaxie-ähnlichen Nebenwirkungen beobachtet werden. Eine Prämedikation mit Prednisolon hat die Reaktion wahrscheinlich verhindert (KLEITER et al. 2010). Van Valenberg et al. beobachteten bei Schweinen, die mit DPPG₂-TSL-DOX intravenös in einer Kombination mit einer Hyperthermie behandelt wurden, eine schwere anaphylaktoide Infusionsreaktion mit lebensbedrohlichen hämodynamischen Störungen, was dazu führte, dass die nachfolgenden Tiere mit Antihistaminika und Steroiden prämediziert wurden (VAN VALENBERG et al. 2021). In einer weiteren Studie von Sebeke et al. wurden bei Schweinen, die mit DPPG₂-TSL-DOX infundiert wurden und zuvor

eine Prämedikation mit Methylprednisolon-Acetat 24 Stunden vor Beginn der Infusion sowie Methylprednisolon, Clemastin und Ranitidin eine Stunde vor Beginn der Liposomen-Infusion erhalten hatten, keine anaphylaktoiden Reaktionen aufgrund der Liposomen-induzierten Komplementaktivierung dokumentiert (SEBEKE et al. 2022).

Liposomen werden von dem angeborenen Immunsystem als fremd erkannt, weil diese Lipid-Vesikel in Größe und Form pathogenen Mikroben und subzellulären Organellen ähneln. Liposomen liegen auch im Größenbereich (100 nm bis 200 nm) von Nanobakterien (SZEKENI et al. 2011).

5. Hyperthermie

5.1. Hintergrundinformationen

Bereits in den 70er Jahren wurde der Vorteil einer Hyperthermie in der Tumorforschung erkannt (WUST et al. 2003). Hyperthermie in der Tumorbehandlung bedeutet eine Temperaturerhöhung des Zielgewebes über die physiologische Körpertemperatur hinaus auf 40 °C bis 44 °C (WUST et al. 2003). Entsprechend dem Ausmaß der hyperthermischen Behandlung und der Tumorlokalisation erfolgt eine Unterteilung in eine Ganz- und Teilkörperhyperthermie sowie lokale, interstitielle und regionale Hyperthermie. Die Hyperthermie ist von den thermoablativen Verfahren, wie beispielsweise laserinduzierte Therapie oder hochfokussierter Ultraschall, bei denen Temperaturen über 60 °C zu einer irreversiblen Koagulationsnekrose führen, zu unterscheiden (WUST et al. 2003). Verschiedene Techniken, wie Ultraschall, Hochfrequenzultraschall, Laser und Mikrowellen, werden zur Erwärmung des Zielgewebes genutzt.

In den späten 70er und frühen 80er Jahren lag der Fokus der Hyperthermie auf dem direkt zytotoxischen Effekt durch hohe Temperaturen. Die synergistischen Effekte einer Hyperthermie in Kombination mit einer Strahlentherapie und Chemotherapie blieben dadurch unerkannt (DEWHIRST et al. 2005). Diese bedeutsamen biologischen Effekte treten beispielsweise in einem Temperaturbereich zwischen 39 °C und 42 °C bei einer Anwendung von einer Stunde auf. Dieser Temperaturbereich liegt zwischen dem, der für die Induktion eines Zelltods notwendig ist und der Normothermie. Zu diesen Effekten zählen die Hemmung der

Reparatur von strahlungsbedingten Schäden, eine Veränderung der Durchblutung, Reoxygenierung, Auswirkungen auf den Transport von Nanopartikeln und Makromolekülen, die Induktion einer Hitzeschock-Antwort und eine immunologische Stimulation (DEWHIRST et al. 2005). TSL-Formulierungen mit einer hohen T_m brauchen hohe Temperaturen, die das gesunde Gewebe in Mitleidenschaft ziehen und ein Schmerzempfinden bei den Patienten auslösen können, daher ist ein Einsatz in der Klinik nicht ohne weiteres möglich (DEWHIRST und SIM 1984, BEN-YOSEF und KAPP 1992, THRALL et al. 1992, LANDON et al. 2011). Bei den LTSL konnte der Temperaturbereich auf 39 °C bis 42 °C herabgesetzt werden (LANDON et al. 2011).

In den Leitlinien für das Qualitätsmanagement in der Hyperthermie (QMHT) wird empfohlen, dass grundsätzlich eine Höchsttemperatur von 43 °C im gesunden Gewebe nicht überschritten werden soll sowie eine Höchsttemperatur von 44 °C für einen längeren Zeitraum im Zielgewebe. Die Temperaturschwelle für irreversible Gewebeschäden liegt in Abhängigkeit vom Gewebetyp zwischen 44 °C und 46 °C (HAVEMAN et al. 2003, YARMOLENKO et al. 2011, BRUGGMOSER et al. 2012).

Aufgrund der Heterogenität der Wärmeleistung des Hyperthermie-Gerätes und Perfusion, die die Wärme abführt, intra- und intertumoral, führt dies zu einer ungleichmäßigen Erwärmung in allen Tumoren (LANDON et al. 2011). Die Berechnung der thermischen Dosis, die bei der Hyperthermie angewandt wird, wurde in das Konzept der TDI (thermal isoeffect dose) integriert. Bei dem TDI-Konzept werden die Erhitzungszeiträume bei unterschiedlichen Temperaturen in äquivalente Heizminuten bei 43 °C umgewandelt. Bei mehreren aufeinanderfolgenden Wärmebehandlungen kann die TDI für jede Therapie addiert werden, um die kumulativen äquivalenten Minuten bei 43 °C (CEM_{43}) zu erhalten (ISSELS 2008, DEWEY 2009, LINDNER und ISSELS 2011).

5.2. Wirkung der Hyperthermie

Es wurde ermittelt, dass die Wärmedosis, die zur Induktion des Zelltods erforderlich ist, eng mit der Energiemenge zusammenhängt, die für die Denaturierung von zellulären Proteinen des Zellkerns, Zellplasmas und der Zellmembran benötigt wird (ISSELS 2008, LINDNER und ISSELS 2011). Darauf beruht die direkte Wärmetoxizität der Hyperthermie bei Temperaturen über 43 °C

(ISSELS 2008). Besonders empfindlich reagieren Zellen auf eine Erwärmung in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus (ISSELS 2008). Eine milde Hyperthermie löst keine direkten chromosomalen Strangbrüche aus, aber verändert die Chromatinstruktur, was sich auf die DNA-Reparatur auswirkt. Durch die Kombination mit einer Strahlentherapie oder Chemotherapie kommt es zu einer Apoptose oder Nekrose und somit zum Zelluntergang. Bei Temperaturen über 40 °C werden Proteine strukturell instabil, sie können sich entfalten (denaturieren), wodurch es zum Funktionsverlust und zur intrazellulären Anhäufung von Aggregaten kommt. Die Zellen reagieren mit einer vermehrten Produktion von molekularen Chaperonen, den sogenannten HSP, insbesondere HSP70 (ISSELS 2008, LINDNER und ISSELS 2011). Es kann eine angeborene Immunantwort ausgelöst werden, da die hitzeinduzierte Expression von HSP auf der Tumorzellmembran zu einer Migration und zytolytischen Aktivität von natürlichen Killerzellen führt (GASTPAR et al. 2005, ISSELS 2008, STANGL et al. 2011). Nekrotische Tumorzellen setzen HSP-Peptid-Komplexe frei, die das Potential haben, antigene Tumor-Peptide antigenpräsentierenden Zellen zu präsentieren und eine T-Zell-Antwort auszulösen (SAUTER et al. 2000, NOESSNER et al. 2002, LINDNER und ISSELS 2011).

5.3. Kombinationstherapien mit Hyperthermie und deren Einsatzgebiete

In vitro gibt es keinen intrinsischen Unterschied zwischen der Wärmeempfindlichkeit von normalen Zellen und Tumorzellen. *In vivo* gibt es jedoch bei Temperaturen zwischen 40 °C und 43 °C einen tumorselektiven Effekt der Hyperthermie. Die Architektur des Gefäßsystems in soliden Tumoren ist im Vergleich zu normalem Gewebe unter normalen Bedingungen chaotisch, daraus resultieren Regionen mit Hypoxie und Areale mit niedrigem pH-Wert (ISSELS 2008, LANDON et al. 2011). Diese macht die Tumorzellen vor allem in schlecht durchbluteten Regionen für die Hyperthermie empfindlicher und die Tumorzellen in hypoxischen und sauren Umgebungen von soliden Tumoren können gezielt zerstört werden (VAUPEL et al. 1989, ISSELS 2008, LINDNER und ISSELS 2011). Die vaskuläre Permeabilität von Tumoren ist bei einer physiologischen Körpertemperatur in Abhängigkeit von der Art des Tumors unterschiedlich. Eine milde Hyperthermie erhöht die Durchblutung und die Permeabilität auch undurchlässiger Gefäße und kann die Extravasation von lang zirkulierenden Nanopartikeln steigern und somit die Medikamentenabgabe an den Tumor erhöhen.

Hypoxische Areale in Tumoren weisen eine schlechte Durchblutung auf, wodurch eine Anreicherung hoher Arzneimittelkonzentrationen nicht möglich ist. Durch eine Erhöhung des Blutflusses infolge der Hyperthermie können die hypoxischen Areale reduziert werden, was einen verbesserten Transport von Arzneimitteln und Sauerstoff zu diesen Arealen ermöglicht (LANDON et al. 2011). Eine Hyperthermie in einem Temperaturbereich von 40 °C bis 43 °C erhöht die Durchblutung und vaskuläre Permeabilität von Tumoren, die entscheidende Faktoren für die Medikamentenaufnahme darstellen (KONG et al. 2000b, ISSELS 2008, LANDON et al. 2011). Diese Wirkungen werden unterhalb der Temperaturschwelle von 40 °C nicht beobachtet und oberhalb der Schwelle kann es zu Blutungen und Gefäßverschlüssen kommen, die die Medikamentenabgabe beeinträchtigen (LANDON et al. 2011).

Durch eine Erhöhung der Durchblutung kann die Hyperthermie hypoxische, strahlenresistente Areale reduzieren. Wust et al. beschreiben einen Verstärkungsfaktor von 1,5 bei einer Strahlentherapie kombiniert mit einer Hyperthermie (WUST et al. 2003). Overgaard et al. randomisierten 134 metastatische oder rezidierte maligne Melanom-Läsionen, um entweder eine alleinige Strahlentherapie oder Strahlentherapie gefolgt von einer Hyperthermie zu erhalten. Bei der kombinierten Therapie aus Strahlentherapie und Hyperthermie zeigte sich eine signifikant höhere Rate für eine komplette Remission (62 %) im Vergleich zu einer alleinigen Strahlentherapie (35 %) (OVERGAARD et al. 2009). Falk und Issels zeigen Studien, in denen auch verbesserte therapeutische Effekte bei einer Kombinationstherapie aus Hyperthermie, Strahlentherapie und Chemotherapie bei verschiedenen Tumorarten beschrieben wurden (FALK und ISSELS 2001). Die Hyperthermie ist Bestandteil einer multimodalen Therapie und wird nur mit anderen onkologischen Therapien, wie Strahlentherapie und/oder Chemotherapie kombiniert (WUST et al. 2003, LINDNER und ISSELS 2011).

Eine synergistische Wechselwirkung zeigen auch viele Chemotherapeutika in Kombination mit einer Hyperthermie, was eine verstärkte zytotoxische Wirkung zur Folge hat (LANDON et al. 2011). Neuere In-vivo-Studien zeigten, dass die thermisch verstärkte Zytotoxizität von Chemotherapeutika in einem Temperaturbereich von 40,5 °C bis 43 °C ihr Maximum hat. Für DOX gibt es eine Schwellentemperatur für die Wechselwirkung mit Wärme von oder nahe bei 42,5 °C (ISSELS 2008). Eine verstärkte zytotoxische Wirkung von Medikamenten

durch gleichzeitige Erwärmung erhöht *in vivo* die Anteile der nekrotischen Bereiche und liefert einen Surrogat-Marker für die Reaktion des Tumors auf die Therapie (LINDNER und ISSELS 2011). Der verstärkende Effekt der Hyperthermie bei der Kombination mit einer Chemotherapie beruht auf einer erhöhten Alkylierung des Chemotherapeutikums und Hemmung der Reparatur von letalen und subletalen Schäden, die durch das Medikament induziert wurden sowie einer erhöhten Medikamentenaufnahme (ISSELS 2008). Zudem hat sich gezeigt, dass der synergistische Effekt bei einer Applikation des Medikamentes unmittelbar vor der Hyperthermie am größten ist (ISSELS 2008). Durch die Kombinationstherapie aus TSL und Hyperthermie wird eine Freisetzung des Wirkstoffs aus den Liposomen in die Tumorblutgefäße ermöglicht (LINDNER und HOSSANN 2010, LANDON et al. 2011).

In einer Studie von Li et al. wurde ein zweistufiger milder Hyperthermie-Ansatz untersucht, um die intratumorale liposomale Wirkstoffanreicherung zu maximieren und die Wirkstofffreisetzung aus TSL auszulösen. Die erste Stufe der Hyperthermie induziert hyperpermeable Tumorgefäße für die Extravasation und Penetration von Liposomen. Danach folgt eine zweite lokale milde Hyperthermie, um die interstitielle DOX-Freisetzung aus den extravasierten DOX-TSL auszulösen und einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Der Fokus lag hierbei auf der interstitiellen anstatt der intravaskulären DOX-Freisetzung zur Vermeidung einer größeren Umverteilung des Wirkstoffes durch den Blutkreislauf und der damit verbundenen Toxizität (LI et al. 2014).

5.3.1. Humanmedizin

Durch die Ergänzung der multimodalen Standardtherapie von Hochrisiko-Weichteilsarkomen durch die RHT, zeigten sich nachweislich sowohl bei einem neoadjuvanten Einsatz als auch nach unvollständiger oder marginaler Entfernung des Tumors bessere rezidiv- und krankheitsfreie Überlebenszeiten (LINDNER und ISSELS 2011). In einer Studie von Van der Zee et al. wurde bei der Anwendung einer Strahlentherapie kombiniert mit einer Hyperthermie bei lokal fortgeschrittenen Zervix-Tumoren eine verbesserte dreijährige lokale Tumorkontrolle (61 % vs. 41 %) und dreijährige Überlebenszeit (51 % vs. 27 %) im Vergleich zu einer alleinigen Strahlentherapie beschrieben (VAN DER ZEE et al. 2000). Wendtner et al. behandelten Patienten mit retroperitonealen und viszerale Hochrisiko-Weichteilsarkomen mit einer Hyperthermie-begleitenden

Chemotherapie und stellten fest, dass bei zuvor operierten Tumoren, bei denen zu Therapiebeginn nur noch mikroskopische Tumorreste vorhanden waren, die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv signifikant höher lag als bei Patienten, deren Tumor nach einer neoadjuvanten Kombinationstherapie aus Hyperthermie und Chemotherapie reseziert wurde (WENDTNER et al. 2002). Die präoperative systemische Chemotherapie hat gegenüber der postoperativen Chemotherapie den Vorteil, dass das Ansprechen auf die Chemotherapie sowohl klinisch als auch pathologisch durch das Vorhandensein eines auswertbaren Tumors bestimmt werden kann, wodurch auch prognostische Informationen gesammelt werden können (SCHLEMMER et al. 2003). Issels et al. verglich 2010 in einer randomisierten Phase-III-Multicenter-Studie mit 341 Patienten eine Chemotherapie als Monotherapie mit einer Kombinationstherapie aus RHT und neoadjuvanter sowie adjuvanter Chemotherapie bei dem humanen Hochrisiko-Weichteilsarkom. Es wurde ein signifikant bessere Ansprechrates und Überlebenszeit in der kombinierten Therapiegruppe dokumentiert (ISSELS et al. 2010). Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei Patienten mit einer Chemotherapie in Kombination mit einer RHT bei 62,7 % im Vergleich zu einer alleinigen neoadjuvanten Chemotherapie mit 51,3 % und die 10-Jahres-Überlebensrate bei 52,6 % in der Kombinationsgruppe im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie mit 42,7 % (ISSELS et al. 2018). Auch in zwei vorangegangenen Studien von Issels et al. zeigte sich das Potential einer Kombinationstherapie aus Hyperthermie und systemischer Chemotherapie bei lokal fortgeschrittenen Sarkomen und lokal fortgeschrittenen primären oder rezidierten Hochrisikoweichteilsarkomen (ISSELS et al. 1991, ISSELS et al. 2001).

Der nächste Schritt war, um die Effizienz zu steigern, freies DOX durch DPPG₂-TSL-DOX zu ersetzen. Aktuell befindet sich DPPG₂-TSL-DOX in einer klinischen Phase-I-Studie in Kombination mit einer RHT zur Therapie von lokal fortgeschrittenen und metastatischen Weichteilsarkomen (EUCT-Nummer 2023-507836-19-00). Erste Daten wurden kürzlich auf der Homepage des Sponsors publiziert¹.

¹ <https://www.thermosome.com/wp-content/uploads/2024/11/CTOS-2024.pdf>, angeschaut am 24.03.2025

5.3.2. Veterinärmedizin

Im Gegensatz zu der Humanmedizin, hat sich die Hyperthermie in der Veterinärmedizin noch nicht etabliert, was sich in wenigen klinischen Studien widerspiegelt. Ogilvie et al. untersuchten 1989 die Effektivität einer Therapie mit freiem DOX bei verschiedenen Tumoren des Hundes und dokumentierte eine Ansprechrate von 22 % (OGILVIE et al. 1989). Hauck et al. zeigten hingegen in einer Studie ein partielles Ansprechen bei 30 % der Patienten bei der Therapie von kaninen Tumoren mit LTSL beladen mit DOX und lokaler Hyperthermie (HAUCK et al. 2006). In einer Phase-II-Studie von Gillette et al. wurde eine kombinierte Therapie aus Strahlentherapie und Hyperthermie bei kaninen Weichteilsarkomen evaluiert. Es zeigte sich eine verbesserte lokale Tumorkontrolle bei der Kombinationstherapie und keine erhöhte Toxizität (GILLETTE et al. 1992). Thrall et al. zeigten 2005 in einer randomisierten Phase-III-Studie bei Hunden mit spontan entstandenen Weichteilsarkomen einen direkten Bezug von der Wärmedosis zur Dauer der lokalen Tumorkontrolle bei bestrahlten kaninen Sarkomen (THRALL et al. 2005). In einer weiteren Studie von Thrall et al. wurde eine größere Wirkung auf die Tumolvolumenreduktion bei der Anwendung einer Fraktion Hyperthermie mit höheren Temperaturen im Vergleich zu drei bis vier Fraktionen mit niedrigeren Temperaturen festgestellt (THRALL et al. 2012).

Matteucci et al. beobachteten, wie in Abschnitt 4.1. bereits erwähnt, in einer Studie über nicht-thermosensitive Technetium-99m-markierte Liposomen in Kombination mit einer Hyperthermie bei feline Fibrosarkomen eine gesteigerte liposomale Akkumulation unter hyperthermischen Bedingungen in soliden Tumoren (MATTEUCCI et al. 2000). In zwei Dosisfindungsstudien fand die Kombinationstherapie aus RHT und DPPG₂-TSL-DOX bei inoperablen Fibrosarkomen von Katzen aus Privatbesitz Anwendung (ZIMMERMANN 2014, TROEDSON 2015). Bei Zimmermann wurde das DPPG₂-TSL-DOX in Dosierungen zwischen 0,1 mg/kg und 0,4 mg/kg eingesetzt. Ein therapeutischer Effekt bei vertretbaren lokalen Nebenwirkungen zeigte sich bereits in einer Dosierung von 0,2 mg/kg (ZIMMERMANN 2014). Da bei Zimmermann die maximal tolerierbare Dosis noch nicht erreicht wurde, erhöhte Troedson in einer weiteren Dosisfindungsstudie die Dosis des DPPG₂-TSL-DOX auf bis zu 1,0 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX. Die Nebenwirkungen waren akzeptabel und eine Tumolvolumenreduktion konnte bei allen therapierten Katzen ab einer Dosis von

0,8 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX verzeichnet werden (TROEDSON 2015).

5.4. Hyperthermie-bedingte Nebenwirkungen

Unerwünscht hohe Temperaturen in der Haut und dem gesunden Gewebe sind bei der Hyperthermie das Hauptrisiko. Dies ist bei Personen mit gestörtem Temperaturempfinden erhöht. Beim Menschen werden Schmerzen, Empfindungsstörungen, Hautirritationen und/oder lokale Ödeme beschrieben. Die Einteilung der Nebenwirkungen erfolgt nach dem zeitlichen Verlauf in akut, subakut und spät. Während der Therapie auftretende Nebenwirkungen, wie Haut- und Abdominalschmerz, Hotspots, Klaustrophobie, Druck durch den Bolus, werden als akut eingestuft. Schmerzen, Ödeme und Verbrennungen, die bis zu sechs Monate nach der Therapie auftreten, werden als subakut bewertet und Nebenwirkungen später als sechs Monate nach der Therapie werden als späte Nebenwirkungen bezeichnet und umfassen Schmerzen, Ödeme und Folgen einer Verbrennung (BRUGGMOSER et al. 2012). Die Einteilung erfolgt gemäß den CTCAE (Common Toxicity Criteria Adverse Events) und dem QMHT (Quality Management in Hyperthermia) (BRUGGMOSER et al. 2012).

Im Falle von anhaltender Überhitzung des Gewebes, in Abhängigkeit vom Schweregrad, kann es zu Gewebeschäden oder Nekrose kommen (BRUGGMOSER et al. 2012).

6. Zielpunkt der Studie

Troedson zeigte in einer Dosisfindungsstudie mit DPPG₂-TSL-DOX und simultaner RHT ab einer Dosis des DPPG₂-TSL-DOX von 0,8 mg/kg einen therapeutischen Effekt bei akzeptablen Nebenwirkungen. Die Dosis wurde bis auf 1,0 mg/kg gesteigert, was der Standarddosis von freiem DOX entspricht (TROEDSON 2015).

Die Studien zeigten einen möglicherweise verbesserten therapeutischen Effekt durch die Anwendung einer thermosensitiven liposomalen Formulierung. Ziel dieser Studie war es, die Effektivität und die Toxizität bei der Anwendung von freiem DOX in einer Dosierung von 1,0 mg/kg und einer simultanen RHT mit der Studie von Troedson, in der DPPG₂-TSL-DOX in einer Dosierung von 1,0 mg/kg in Kombination mit einer simultanen RHT angewandt wurde, bei Katzen mit inoperablen FISS zu vergleichen, um die Effizienz von thermosensitiven

liposomalen DOX zu beurteilen (TROEDSON 2015). Die vorliegende Studie unterteilte sich in zwei Therapiegruppen. Primäre Endpunkte in dieser Studie waren die Evaluierung der Pharmakokinetik, der Toxizität sowie die Beurteilung des therapeutischen Effektes und die Bestimmung der DOX-Konzentration im Tumorgewebe im Vergleich von freiem DOX und DPPG₂-TSL-DOX jeweils in einer Dosierung von 1,0 mg/kg mit einer simultanen RHT.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Rekrutierung der Patienten

1.1. Therapiegruppe I

Therapiegruppe I beinhaltete sieben Therapiezyklen mit freiem DOX und einer simultanen RHT im zweiwöchigen Abstand. Eine Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie war ein am Rumpf lokalisiertes Fibrosarkom mit einem inoperablen Tumorstadium. Es wurden Tiere für die Studie ausgewählt, deren Tumor einen Durchmesser von 2,5 cm nicht unterschritten und einen Durchmesser von 5,5 cm nicht überschritten hat, um eine sachgerechte Anwendung des Hyperthermie-Gerätes zu garantieren. Katzen, bei denen zusätzlich eine kardiale oder renale Begleiterkrankung sowie eine Infektion mit FeLV vorlagen, wurden aus der Studie exkludiert. Patienten, deren Fibrosarkom mit einem Chemotherapeutikum vorbehandelt wurde, wurden ebenfalls nicht in die Studie aufgenommen, da die Gefahr einer Resistenz bestand. Ein Ausschluss galt auch für Katzen, die nach einer zuvor angewandten Strahlentherapie ein Rezidiv entwickelten. Eine zuvor strahlentherapeutisch behandelte Hautpartie ist im Vergleich zu einer unbehandelten Haut dünner, wodurch wahrscheinlich das Risiko lokaler Nebenwirkungen durch eine RHT gestiegen wäre. Ein weiteres Ausschlusskriterium war eine zu erwartende Überlebenszeit unter sechs Monaten. Metastasen stellten keinen Grund für einen Studienausschluss dar, da die Patienten mit einer systemisch wirksamen Chemotherapie behandelt wurden. Katzen, deren Fibrosarkom an einer Gliedmaße lokalisiert war, sind nicht für die Studie in Erwägung gezogen worden, weil in diesem Fall eine Gliedmaßen-Amputation als Therapie der Wahl erachtet wird.

In die Studie wurden fünf Katzen von verschiedenen privaten Eigentümern eingeschlossen. Die Diagnose des feline Fibrosarkoms wurde zytologisch oder histologisch gestellt.

Von den fünf Katzen wurden drei mit einem inoperablen Primärtumor und zwei mit einem inoperablen Rezidiv vorgestellt.

Gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde ein Antrag auf Genehmigung eines Tierversuches eingereicht und bewilligt (AZ: 55.2-1-54-2532-93-2014).

1.2. Therapiegruppe II

Therapiegruppe II beinhaltete eine Therapiesitzung mit einer anschließenden Resektion des Tumors. 50 % der Patienten erhielten bei der einmaligen Therapiesitzung freies DOX und eine simultane RHT und 50 % DPPG₂-TSL-DOX in Kombination mit einer RHT. Primäres Aufnahmekriterium bei dieser Therapiegruppe war das Vorhandensein eines operablen feline Fibrosarkoms mit einem Tumordurchmesser von mindestens 2,5 cm und einer Lokalisation am Rumpf. Katzen, die mit einem Chemotherapeutikum vorbehandelt wurden oder unter einer kardialen oder renalen Begleiterkrankung, wie bei der Therapiegruppe I unter 1.1 aufgeführt, litten, wurden von der Studie ausgeschlossen. Eine strahlentherapeutische Vorbehandlung stellte bei der Therapiegruppe II im Vergleich zu Therapiegruppe I kein Ausschlusskriterium dar, da es sich um eine einmalige Therapiesitzung handelte und im Anschluss eine radikale chirurgische Exzision des Tumors erfolgte, womit ein erhöhtes Risiko für lokale Nebenwirkungen der Haut infolge einer RHT als gering erachtet wurde. Ein weiteres Ausschlusskriterium war das Vorliegen von Metastasen, da mit einer einmaligen Therapie und der Applikation von DPPG₂-TSL-DOX bei drei von sechs Patienten eine effektive Behandlung der Metastasen nicht gewährleistet war.

Sechs Katzen, ebenfalls aus unterschiedlichen privaten Haushalten, mit einer zytologisch oder histologisch bestätigten Diagnose eines am Rumpf lokalisierten feline Fibrosarkoms, wurden in die Studie aufgenommen.

Fünf der sechs Katzen sind mit einem operablen Primärtumor und eine Katze mit einem operablen Rezidiv vorgestellt worden. Die Operabilität wurde mit einer CT-Untersuchung bestätigt.

Gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde ein Antrag auf Genehmigung eines Tierversuches eingereicht und bewilligt (AZ: 55.2-1-54-2532-93-2014).

2. Voruntersuchungen

2.1. Therapiegruppe I

Die fünf ausgewählten Patienten erhielten identische Eingangsuntersuchungen, die zum einen als Tumorscreening und zum anderen der Evaluierung des Gesundheitszustandes, zur Ermittlung weiterer Erkrankungen und der Narkosefähigkeit, dienen sollten. Hierzu zählten ein Blutbild mit

Differentialblutbild und eine klinische Serumchemie sowie eine Bestimmung des Gesamtthyroxins. Bei allen fünf Katzen erfolgte eine kardiale Untersuchung, die eine ultrasonographische Beurteilung des Herzens, ein Elektrokardiogramm, eine Blutdruckmessung und eine Bestimmung des Troponin I aus dem Blut beinhaltete. Außerdem wurde eine Ultraschalluntersuchung des Abdomens sowie ein Thorax-Röntgen in drei Ebenen bei jedem Patienten durchgeführt. Die Tumorgröße (Länge in cm x Breite in cm x Tiefe in cm) wurde unter Anwendung einer elektronischen Schieblehre (Brown & Sharpe, TESA, Schweiz) ebenfalls ermittelt. Das gesamte Ausmaß des Tumors und dessen Gefäßversorgung konnte durch die Kombination einer Positronenemissionstomographie mit einer Magnetresonanztomographie (PET-MRT, 3,0 Tesla, Biograph mMR, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn) bei vier Patienten (# II, III, IV, V) eruiert werden. Bei dem hierfür verwendeten Radiopharmakon handelte es sich um FDG (^{18}F -Fluordesoxyglucose). Patient # I erhielt eine MRT-Untersuchung (1.5 Tesla Magnetom, Symphony, Siemens Health Care, Erlangen).

Die Auswertung der PET-MRT und MRT ist kein Bestandteil dieser Dissertation.

2.2. Therapiegruppe II

Die Eingangsuntersuchungen, die bei der Therapiegruppe II ausgeführt wurden, dienten wie bei der Therapiegruppe I einerseits der Beurteilung des Gesundheitszustandes des Patienten und andererseits dem Tumorscreening. Sie beinhalteten ein Blutbild mit Differentialblutbild sowie eine klinische Serumchemie. Es wurden Röntgenbilder des Thorax in drei Ebenen erstellt und das Abdomen mittels eines Ultraschall-Gerätes untersucht. Weitere Untersuchungen, wie beispielsweise die Bestimmung des Gesamtthyroxins, die standardisiert in der Therapiegruppe I erfolgten, wurden bei der Therapiegruppe II, in der ausschließlich eine Therapiesitzung durchgeführt wurde, nur bei Auffälligkeiten in der Eingangsuntersuchung eingeleitet. Von allen sechs Katzen wurde vor Beginn der Therapie eine CT-Untersuchung angefertigt, um die Operabilität des Tumors beurteilen zu können, da ausschließlich Katzen mit einem operablen Fibrosarkom in die Therapiegruppe II inkludiert wurden.

3. Therapieprotokoll

3.1. Therapiegruppe I²

Das für alle Katzen der Therapiegruppe I vorgesehene Behandlungsprotokoll schloss sieben Therapiezyklen in einem zweiwöchigen Abstand ein. Jeder dieser Behandlungszyklen implizierte die streng intravenöse Applikation von freiem DOX in einer Dosierung von 1,0 mg/kg über einen Zeitraum von 15 Minuten. Das freie DOX wurde den Patienten simultan zu der RHT verabreicht. Eine Ausnahme stellte die erste Therapiesitzung dar, da diese ohne eine Hyperthermie verlief. Der Grund hierfür war die Bestimmung der Pharmakokinetik des Medikaments *in vivo* ohne eine RHT und die Beurteilung der Verträglichkeit des Chemotherapeutikums. Eine weitere pharmakokinetische Untersuchung des freien DOX unter Einfluss der Hyperthermie hat in der zweiten Therapiesitzung stattgefunden. Jeder Therapiezyklus ist unter Allgemeinanästhesie durchgeführt worden.

3.1.1. Untersuchungen während der Therapie

Wie bei einer klassischen Behandlung mit einem Chemotherapeutikum üblich, erfolgte in dieser Studie vor und sieben Tage nach der Applikation des Chemotherapeutikums eine klinische Allgemeinuntersuchung, die Erstellung eines Blutbildes mit Differentialblutbild sowie eines Serumprofils inklusive einer Messung der Elektrolyte und eine manuelle Vermessung des Tumors mit einer elektronischen Schieblehre (Brown & Sharpe, TESA, Schweiz).

3.1.2. Abschlussuntersuchungen nach den Therapiezyklen

Nach dem Abschluss der Therapie erfolgte ebenfalls eine Allgemeinuntersuchung, eine Vermessung des Tumors mit einer elektronischen Schieblehre (Brown & Sharpe, TESA, Schweiz) und die Einleitung eines Blutbildes mit Differentialblutbild sowie eines Serumprofils inklusive einer Messung der Elektrolyte. Bei der Abschlussuntersuchung wurde ebenfalls wieder das Gesamtthyroxin und Troponin I bestimmt. Zudem wurde eine Sonographie des Abdomens sowie eine ultrasonographische Untersuchung des Herzens inkl. der Erstellung eines Elektrokardiogramms und einer Blutdruckmessung und eine röntgenologische Untersuchung des Thorax in drei Ebenen durchgeführt. Diese Untersuchungen dienten zum einen der Detektion von Erkrankungen, die in Folge

² Übersicht siehe Anhang XI, Kapitel 1, Tabelle 2, Seite 92

der Therapie entstanden sein könnten und unabhängig vom Tumor sind und zum anderen als Re-Staging. Die PET-MRT- bzw. MRT-Untersuchungen (Patient # I) nach Abschluss der sieben Therapiezyklen dienten der Planung der chirurgischen Exzision der Tumoren und der Evaluierung des Ansprechens der Tumore.

3.2. Therapiegruppe II³

Das Therapieprotokoll für Therapiegruppe II hatte einen einmaligen Behandlungszyklus unter Allgemeinanästhesie zum Inhalt. 50 % der Katzen wurden mit einer RHT und der simultanen Verabreichung von freiem DOX in einer Dosierung von 1,0 mg/kg, streng intravenös über einen Zeitraum von 15 Minuten, und 50 % der Katzen mit einer RHT und der simultanen Applikation von DPPG₂-TSL-DOX, ebenfalls bezogen auf die Wirkstoffdosis des eingeschlossenen DOX in einer Dosierung von 1,0 mg/kg streng intravenös über einen Zeitraum von 15 Minuten, behandelt. Im Anschluss erfolgte die Resektion des Tumors innerhalb von 60 min nach Abschluss der Hyperthermie-Sitzung von Prof. Andrea Meyer-Lindenberg in der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der LMU München. Vor Beginn der Therapiesitzung und sieben Tage nach der Applikation des freien DOX bzw. des DPPG₂-TSL-DOX wurden die Patienten klinisch allgemein untersucht und ein Blutbild mit Differentialblutbild sowie ein Serumprofil einschließlich einer Elektrolytmessung aus ihrem Blut angefertigt. Zu den Untersuchungen vor Beginn der Therapiesitzung gehörte ebenfalls eine manuelle Ausmessung des Tumors.

4. Anwendung der regionalen Hyperthermie

4.1. Therapiegruppe I

4.1.1. Ablauf der regionalen Hyperthermie

Es wurde ein BSD Medical Controlling System mit einem Oberflächen-Applikator (MA-151 Mini Dual Ridge Hyperthermia Applicator, BSD Medical Corporation, Salt Lake City, USA) für die Anwendung der RHT genutzt. Der Applikator hat eine Eindringtiefe von 2,5 cm.

Drei Temperatursonden wurden zur Temperaturkontrolle an der Haut auf der Oberfläche des Tumors, rektal und innerhalb des Tumors platziert

³ Übersicht siehe Anhang XI, Kapitel 1, Tabelle 3, Seite 94

(BRUGGMOSER et al. 2012). Eine Temperaturmessung mit geeigneten Messsonden ist entsprechend den Leitlinien zum Qualitätsmanagement in der Hyperthermie äußerst wichtig, um therapeutisch notwendige Temperaturen im Zielvolumen zu bestimmen und unerwünschte Hotspots im umliegenden Normalgewebe zu vermeiden sowie Risikoorgane zu schonen. Auch die systemische Körpertemperatur muss regelmäßig erfasst werden (BRUGGMOSER et al. 2012). Eine invasive Bormann-Sonde wurde in den Tumor eingeführt und in Basisnähe sowie dem Zentrum des Tumors positioniert. Die intratumorale Sonde wurde zur Kontrolle der Temperatur manuell entlang des Führungskanals im Tumor verschoben, um eine möglichst konstante Erwärmung des Tumors zu erreichen und Temperaturabweichungen bestmöglich zu detektieren. Die Temperaturwerte wurden hierzu jede Minute dokumentiert. Die Energiemenge für die Erwärmung des Tumors auf die Zieltemperatur wurde automatisch an den vorher gemessenen Wert angepasst. Eine zweite Temperatursonde wurde im 90°-Winkel zu der intratumoralen Temperatursonde, auf der Haut, im Zentrum des Tumors, zur Kontrolle der Hauttemperatur nicht invasiv platziert (siehe **Abbildung 1**).



Abbildung 1: Lokalisation der intratumoralen Sonde und Hauttemperatursonde im 90°-Winkel zueinander.

Zwischen dem Applikator und dem zu erwärmenden Tumor befindet sich ein Bolus, der mit destilliertem Wasser gefüllt und an den Applikator gekoppelt ist. Er verbessert die Wärmeleitung in die Tiefe und optimiert die Ankopplung des Applikators an das Tumorgewebe (siehe **Abbildung 2**). Durch ein sich anschließendes Kühlungssystem zirkuliert das destillierte Wasser im Bolus, wodurch die Hauttemperatur reguliert werden kann, um Hautverbrennungen vermeiden zu können. Zudem kann neben der Änderung der zirkulierenden Wassertemperatur auch die Änderung des Füllungszustandes des Bolus die Vermeidung von Hautverbrennungen unterstützen. Die gewünschte

Hauttemperatur lag zwischen 35 °C und 38 °C und eine maximale Temperatur von 39 °C sollte nicht überschritten werden. Eine dritte Temperatursonde wurde rektal zur Kontrolle der Körpertemperatur unter Therapie eingeführt.

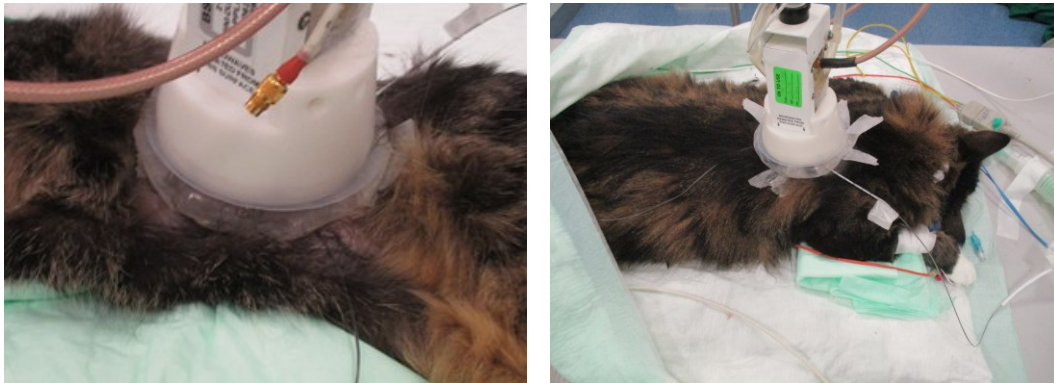


Abbildung 2 (links): Positionierung des Applikators des Hyperthermie-Gerätes auf dem Tumor. **Abbildung 3 (rechts):** Eine Therapie mit dem Hyperthermie-Gerät.

Zu Beginn des Therapiezyklus wurde der Tumor auf eine Zieltemperatur von 42 °C erwärmt, die Erwärmung sollte hierbei möglichst homogen erfolgen. Die Applikation des freien DOX erfolgte streng intravenös über einen Zeitraum von 15 Minuten, nachdem die Zieltemperatur erreicht wurde. Die berechnete Menge an freiem DOX für jede Sitzung wurde hierfür mit einer Glukose-Infusionslösung 5 % (G-5 Glucose 5 % B. Braun, Melsungen, Deutschland) versetzt, um auf eine Infusionsmenge von insgesamt 10 ml für die Infusion über einen Zeitraum von 15 Minuten zu gelangen.

Die Gesamttherapiedauer betrug 60 Minuten und erfolgte in Vollnarkose. Alle Katzen wurden mit freiem DOX simultan mit einer RHT therapiert, mit Ausnahme der ersten Therapiesitzung, hier wurde keine simultane RHT durchgeführt.

4.1.2. Anästhesie

Für jede Therapiesitzung und die PET-MRT- bzw. MRT-Untersuchungen wurde eine generelle Anästhesie des Patienten nach einem standardisierten Studienprotokoll angewandt, wobei sich das Anästhesieprotokoll der Therapiesitzungen von dem Protokoll der Bildgebungen unterschieden hat.

Vor der Narkoseeinleitung wurden alle Patienten mit Methadon (Comfortan[®], Bladel, Niederlande) 0,2 mg/kg intravenös vorbehandelt, nach zehn Minuten wurde die Narkose mit Alfaxalon (Alfaxan[®], Vétquinol, Ravensburg, Deutschland) 2 mg/kg intravenös eingeleitet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mittels

des Inhalationsanästhetikums Isofluran (Isofluran Baxter®, Baxter Unterschleißheim, Deutschland), wofür alle Patienten intubiert wurden. Für jede Therapiesitzung erhielten die Studienpatienten eine Infusionstherapie mit Sterofundin® ISO (B. Braun, Melsungen, Deutschland) zwei Stunden vor Beginn der Anästhesie mit einer Infusionsrate von 10 ml/kg/h. Die Flüssigkeitsapplikation diente zum einen der Nierenentlastung während der Anästhesie und zum anderen um die Blutverluste infolge der Blutentnahme für die Pharmakokinetik auszugleichen. Nach der Applikation des freien DOX wurde die Infusionstherapie mit Sterofundin® ISO (B. Braun, Melsungen, Deutschland) mit der gleichen Infusionsrate wie vor Beginn der Therapiesitzung fortgeführt.

Es erfolgte alle fünf Minuten eine Lidreflexkontrolle sowie Kontrolle der Schleimhautfarbe. Des Weiteren wurde ein Elektrokardiogramm, eine Blutdruckmessung mittels Doppler, Kapnographie und Pulsoxymetrie durchgeführt. Die innere Körpertemperatur wurde mit Hilfe der rektalen Temperatursonde, die im Rahmen der Hyperthermie-Behandlung eingeführt wurde, erfasst.

Eine Auswertung der erfassten Narkoseparameter sowie das Narkoseprotokoll der Bildgebungen sind nicht Bestandteil dieser Arbeit.

4.1.3. Probenentnahme von Blutplasma

Zur Durchführung einer pharmakokinetischen Untersuchung wurden Blutproben von jeweils 1 ml zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Die Blutprobenentnahmen erfolgten sowohl vor Beginn der Infusion des freien DOX zum Zeitpunkt 0 sowie nach dem Start der DOX-Infusion jeweils zum Zeitpunkt 7, 15, 30, 45, 60, 75, 105 und 135 Minuten. Das Blut wurde über einen peripheren Venenverweilkatheter (Vasofix® Certo, 1,1 x 25 mm, G20, rosa, B. Braun, Melsungen, Deutschland), der zwischen den Entnahmen mit einem Mandrin (Vasofix® Mandrin 1,1 mm/G20, rosa, B. Braun, Melsungen, Deutschland) verschlossen wurde, entnommen und mit Hilfe einer EDTA-beschichteten Multivette (Multivette® 600, Sarstedt, Deutschland) gewonnen. Die ersten Tropfen wurden bei den einzelnen Entnahmen verworfen. Für den peripheren Verweilkatheter wurde die V. saphena medialis oder V. cephalica antebrachii gewählt. Innerhalb von 30 Minuten nach der Entnahme wurde das gewonnene Blut weiterverarbeitet. Das Blut wurde bei 4 °C zentrifugiert (4000x g über 5 Minuten),

das Plasma abpipettiert und bis zum Zeitpunkt der Analyse bei -30 °C und darauffolgend bei -80 °C eingefroren.

4.2. Therapiegruppe II

4.2.1. Ablauf der Hyperthermie und Anästhesie

Von den insgesamt sechs Katzen wurden drei Katzen mit freiem DOX (# VI, VII, VIII) und drei Katzen mit DPPG₂-TSL-DOX (# IX, X, XI) jeweils simultan mit einer RHT therapiert. Die Gesamttherapiedauer betrug 60 Minuten und erfolgte in Vollnarkose. Im Anschluss der Therapiesitzung wurde der Tumor chirurgisch entfernt.

Die Anwendung der RHT, unter Ausnahme der Probenentnahme von Blutplasma, bei Therapiegruppe II entsprach der Vorgehensweise von Therapiegruppe I. Bei den drei Katzen, die DPPG₂-TSL-DOX verabreicht bekommen haben, wurde besonders auf eine mögliche CARPA-Reaktion geachtet. Auch bei der Anwendung von DPPG₂-TSL-DOX wurde die berechnete Menge für jede Sitzung mit einer Glukose-Infusionslösung von 5 % (G-5 Glucose 5 % B. Braun, Melsungen, Deutschland) versetzt, um eine Infusionsmenge von insgesamt 10 ml zu erhalten.

4.2.2. Probenentnahme

4.2.2.1. Chirurgische Exzision des Tumors

Nach der Beendigung der Therapiesitzung wurde der Tumor zur Bestimmung der DOX-Konzentration chirurgisch entfernt und umgehend bis zum Zeitpunkt der Weiterverarbeitung bei -30 °C und später bei -80 °C eingefroren. Die chirurgische Exzision wurde von Prof. Andrea Meyer-Lindenberg in der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der LMU München durchgeführt.

4.2.2.2. Probenentnahme von Blutplasma

Neben der Tumorsektion wurden zur Bestimmung der DOX-Konzentration zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Blutproben von je 1 ml entnommen. Die erste Blutprobenentnahme erfolgte vor dem Beginn der chirurgischen Exzision des Tumors und die zweite Blutprobenentnahme nach Abschluss der Operation.

Der Ablauf der Blutprobenentnahme sowie die anschließende Verarbeitung des Blutes entsprach der Verfahrensweise von Therapiegruppe I.

5. Herstellung und Charakterisierung der Liposomen

Die Herstellung und Charakterisierung der Liposomen erfolgte gemäß der Beschreibung von Hossann et al. und wurde von der Arbeitsgruppe Liposomen des LMU Klinikums – Campus Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt (HOSSANN et al. 2007, HOSSANN et al. 2010, HOSSANN et al. 2012). Die Liposomen wurden nach der Lipidfilm-Hydratisierungs- und Extrusionsmethode hergestellt. Die in der vorliegenden Studie verwendeten Phospholipide 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin und DPPG₂ wurden in einem Rundkolben im molaren Verhältnis 50:20:30 (mol/mol) in Chloroform aufgelöst. Um einen dünnen und homogenen Lipidfilm zu erhalten, wurde das Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer unter Vakuum verdampft. Die Hydratation des Films erfolgte mit 300 mM Citrat, pH 4, bei 60 °C für 30 Minuten. Die resultierende Lipidkonzentration betrug 50 mM. Unilamellare Vesikel wurden nach einer zehnfachen Hochdruckextrusion (LIPEXTM Thermobarrel-Extruder, Northern Lipids Inc. Burnaby, BC, Kanada) bei 60 °C durch Polykarbonat-Filter mit einer Größe von 200 nm gebildet. Die Beladung der TSL mit DOX erfolgte pH-Gradienten-gesteuert. Der pH-Gradient wurde durch Titration mit 1 M NaHCO₃, pH 8 erzeugt. Es erfolgte eine Verdünnung bis zu einem molaren Wirkstoff/Lipid-Verhältnis von 0,13 (mol/mol) und eine Inkubation bei 38 °C, bis die DOX-Beladung abgeschlossen war. Spuren von nicht eingekapselten DOX wurden durch Zentrifugation (75.000 xg) entfernt, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 mM HEPES, 150 mM NaCl (HN-Puffer), pH 7,4 resuspendiert.

Nach der Charakterisierung der Liposomen wurden nur die Chargen verwendet, die den Spezifikationen entsprechen. Die Charakterisierungsmethoden umfassen eine Phosphatanalyse zur Bestimmung der Phospholipid-Konzentration und eine Dünnschichtchromatographie zur quantitativen Bestimmung der Phospholipid-Zusammensetzung. Die Größe der Vesikel und die Breite der Größenverteilung (Polydispersitätsindex, PDI) wurden durch eine dynamische Lichtstreuung und der DOX-Gehalt sowie dessen Freisetzung durch eine Fluoreszenzspektroskopie ermittelt (HOSSANN et al. 2007, HOSSANN et al. 2010, HOSSANN et al. 2012, LIMMER et al. 2014). Die Überprüfung der Qualität der Chargen erfolgte nach dem Verfahren, wie es Zimmermann et al. beschrieben haben, um unzureichende Chargen auszuschließen (ZIMMERMANN et al. 2017).

In dieser Studie wurden zwei Chargen verwendet, deren Spezifikationen im Anhang XI, Kapitel 5, **Abbildung 11** und **Abbildung 12**, Seite 99 bis 100, zu finden sind.

6. Pharmakokinetik

6.1. Bestimmung der DOX-Konzentration in Blut- und Gewebeproben beider Therapiegruppen

Mit Hilfe einer High performance liquid Chromatography (HPLC) durch ein Waters HPLC System (510 HPLC-Pumpe, 717plus Autosampler und 470 Fluoreszenzdetektor, Waters HPLC, Eschborn, Deutschland) wurde die DOX-Konzentration in den Proben bestimmt (GALETTIS et al. 1994, WILLERDING et al. 2016). Die Proben wurden durch eine Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Isopropanol (J.T Baker-Avantor Performance Materials, Center Valley, USA) und Chloroform (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) vorbereitet. Daunorubicin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) wurde als Interner Standard und eine DOX-Lösung (Adrimedac®/Doxorubicin Accord®, Bendalis GbmH/ medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH) als Referenzstandard verwendet. Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Excitationswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 560 nm (GALETTIS et al. 1994). Die Bestimmung der DOX-Konzentration in den Blut- und Gewebeproben sowie die pharmakokinetische Auswertung erfolgte durch die Arbeitsgruppe Liposomen des LMU-Klinikums – Campus Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München.

6.2. Ermittlung der AUC und ID

Aus dem Integral der gemessenen Konzentration des DOX im Plasma in $\mu\text{g/ml}$ wurde die Fläche unter der Kurve (AUC_{0-135}) von $t = 0$ bis 135 Minuten bestimmt. Die theoretische Maximalkonzentration (ID) für den Wirkstoff wurde aus der verabreichten Dosis ermittelt. Es wird für die Berechnung angenommen, dass das Plasmavolumen einer Katze 4 % des Körpergewichtes ausmacht. Die Plasmakonzentration von DOX wurde für die Zeitpunkte $t = 15$ Minuten zum Ende der DOX-Infusion bis $t = 135$ Minuten in ein pharmakokinetisches Zwei-Kompartiment-Modell (OriginPro 8.1.5, OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) integriert (LIMMER et al. 2014). Sie wird als prozentualer Anteil der maximalen Konzentration (% ID) ausgedrückt.

7. Bestimmung der Toxizität

Eine Beurteilung der Hyperthermie-spezifischen Nebenwirkungen erfolgte gemäß den CTCAE und dem QMHT in akut, subakut und spät (BRUGGMOSER et al. 2012). Die spezifischen Nebenwirkungen des freien DOX wurden entsprechend der Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG-CTCAE V1.1) bewertet.

7.1. Therapiegruppe I

Vor jeder Therapiesitzung und sieben Tage nach jeder Sitzung fand eine klinische Untersuchung sowie eine Kontrolle des Blutbildes und der Serumchemie inkl. Elektrolytmessung statt, um Nebenwirkungen der Therapie zu detektieren. Des Weiteren wurde vor Beginn und nach Abschluss der Therapiezyklen eine Herzuntersuchung mittels Echokardiogramm und Ultraschall durchgeführt, um eine kumulative Kardiotoxizität durch freies DOX, wie sie bei Hunden und Menschen beschrieben ist, auszuschließen.

7.2. Therapiegruppe II

Vor und sieben Tage nach der Therapiesitzung erfolgte eine klinische Untersuchung sowie eine Blutbild- und Serumchemiekontrolle inkl. Elektrolytmessung zur Beurteilung von Nebenwirkungen nach der einmaligen Therapiesitzung.

8. Tumoransprechen

Eine Beurteilung des Tumoransprechens erfolgte mittels einer manuellen Handmessung mit einer elektronischen Schieblehre (Brown & Sharpe, TESA, Schweiz). Die anhand der manuellen Handmessungen ermittelten Tumolvolumina wurden von Therapiezyklus zu Therapiezyklus miteinander verglichen. Die Messungen erfolgten in Narkose vor Beginn der einzelnen Sitzungen und zu den PET-MRT- bzw. MRT-Untersuchungen, die ebenfalls zur Beurteilung des Tumorumfanges herangezogen wurden (Daten sind nicht Bestandteil dieser Arbeit) sowie im wachen Zustand zu den Kontrolluntersuchungen. Die Tumormesspunkte, die spezifisch für jeden Tumor festgelegt wurden, wurden bei jeder Messung beibehalten und wenn es möglich war, erfolgten die Messungen stets von derselben Person. Es hat sich herausgestellt, dass die Formel $V = \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe} \times \pi/6$ zur Berechnung des Tumorumfanges geeignet ist, wofür bei jeder Kontrolle die Tumoren in ihrer „Länge“, „Breite“ und „Höhe“ ausgemessen wurden.

(HARRINGTON et al. 2001). Nach den RECIST-Kriterien (response evaluation criteria in solid tumours) wurde die Änderung des Tumolvolumens als partielle Remission (Verringerung des Tumolvolumens um 30 %), als progressive Erkrankung (Zunahme des Tumolvolumens um mindestens 20 %) oder als stabile Erkrankungen (Volumenänderungen zwischen den beiden bereits genannten) eingestuft (EISENHAUER et al. 2009).

9. Chirurgie und Strahlentherapie nach Abschluss der Therapiestudie

9.1. Therapiegruppe I

Nach Abschluss der Behandlungszyklen erhielten die Katzen, insofern eine chirurgische Exzision des Tumors in Abhängigkeit von dessen Größe und dem Auftreten von Metastasen durchführbar gewesen ist, eine strahlentherapeutische Behandlung. Patienten mit histologisch tumorfreien Exzisionsrändern wurden nach der Operation mit einer definitiven Strahlentherapie in 15 Sitzungen zu je 2,5 Gy behandelt, wohingegen Patienten mit histologisch nicht tumorfreien Exzisionsrändern eine palliative Strahlentherapie in fünf Sitzungen zu je sechs Gray erhielten.

9.2. Therapiegruppe II

Da eines der Einschlusskriterien von Therapiegruppe II das Vorliegen eines operablen Tumors gewesen ist, erhielten alle Katzen im Anschluss an die Therapiestudie nach der Tumorexstirpation eine strahlentherapeutische Behandlung. Ob die Katzen eine definitive oder palliative Strahlentherapie erhielten, war wie in Therapiegruppe I abhängig von den Exzisionsrändern. Die Wahl des Strahlentherapieprotokolls war auch abhängig von dem Vorliegen eines Primärtumors oder eines Rezidivs wie bei dem Patienten # VIII, der mit einem Rezidiv vorgestellt wurde und die Therapie des Primärtumors zuvor bereits eine definitive Strahlentherapie beinhaltet hatte. Bei den Patienten mit tumorfreien Exzisionsrändern (R0) und bei den Patienten mit nicht tumorfreien Exzisionsrändern (R1) wurden jeweils dieselben Strahlentherapieprotokolle verwendet wie in der Therapiegruppe I.

10. Follow-up

10.1. Therapiegruppe I

Nach Abschluss der Therapie wurde für eine längerfristige Evaluierung des Tumoransprechens, nach vier Wochen, drei Monaten, sechs Monaten und zwölf Monaten eine klinische Allgemeinuntersuchung von jedem Patienten oder, wenn eine persönliche Vorstellung des Tieres in der Klinik nicht möglich war, eine Kommunikation mit dem überweisenden praktizierenden Tierarzt und eine telefonische Patientenbesitzerkommunikation ausgeführt.

10.2. Therapiegruppe II

Im Rahmen der Studie wurden zu der Beurteilung des Tumoransprechens bei dieser Therapiegruppe keine Follow-up-Daten erhoben.

IV. ERGEBNISSE

1. Patientendaten

Es wurden insgesamt fünf Patienten für Therapiegruppe I sowie sechs Patienten für Therapiegruppe II aus Privatbesitz in dem Zeitraum von April 2015 bis September 2016 rekrutiert.

1.1. Therapiegruppe I

Ein Patient aus Therapiegruppe I war männlich kastriert (# I) und vier Patienten weiblich kastriert (# II, III, IV, V). Das mediane Alter betrug 12 Jahre (Varianz 6 Jahre bis 15 Jahre) und das mediane Körpergewicht lag bei 4,52 kg (Varianz 3,09 kg bis 5,24 kg). Vier der fünf Katzen gehörten der Rasse Europäisch Kurzhaarkatze an (# I, II, III, V) und bei einer Katze handelte es sich um eine Norwegische Waldkatze (# IV).

Drei der fünf Studienpatienten (# I, III, IV) wurden mit einem Primärtumor vorgestellt und zwei der fünf Katzen (# II, V) mit einem Rezidiv nach einer chirurgischen Vorbehandlung. Alle fünf Patienten wurden vor der Aufnahme in die Studie weder strahlentherapeutisch noch chemotherapeutisch vorbehandelt.

Die Tumoren zeigten sich in unterschiedlichen Lokalisationen am Rumpf. Zwei der fünf Katzen wiesen eine Lokalisation an der lateralen Bauchwand auf. Bei einer der beiden Katzen präsentierte sich der Tumor an der linken Bauchwand (# II) und bei der zweiten Katze an der rechten Bauchwand (# V). Diesen nachfolgend waren gleichermaßen Tumoren an der linken Thoraxwand (# I), auf der Brustwirbelsäule (# III) und interskapulär (# IV) lokalisiert.

Das mediane Tumolvolumen lag bei 13,48 cm³ (Varianz 7,7 cm³ bis 40,17 cm³) und das durchschnittliche Tumolvolumen bei 16,65 cm³. Eine Übersicht zu den Tumorcharakteristika der Therapiegruppe I befindet sich im Anhang XI, Kapitel 2, **Tabelle 4**, Seite 95.

1.2. Therapiegruppe II

Drei Patienten aus der Therapiegruppe II waren männlich kastriert (# VII, VIII, X) und ein Patient männlich (# VI), zwei Patienten waren weiblich kastriert (# IX, XI). Das mediane Alter lag bei 9,5 Jahren (Varianz 7 Jahre bis 11 Jahre) und das mediane

Körpergewicht betrug 4,72 kg (Varianz 2,39 kg bis 8,7 kg). Fünf der sechs Katzen waren Europäisch Kurzhaarkatzen (# VI, VII, IX, X, XI) und eine Katze eine Maine Coon (# VIII).

Fünf der sechs Studienpatienten wurden mit einem Primärtumor vorgestellt (# VI, VII, IX, X, XI) und ein Patient mit einem Rezidiv nach einer chirurgischen und definitiven strahlentherapeutischen Vorbehandlung (# VIII).

Die Tumoren waren in unterschiedlichen Bereichen des Rumpfes lokalisiert. Vier Tumoren waren an der Bauchwand lokalisiert. Zwei Tumoren davon lagen im Bereich der linken dorsalen Bauchwand (# VI, IX), einer an der rechten dorsalen Bauchwand (# X) und ein weiterer an der linken rippengestützten Bauchwand (# XI). Diesen nachfolgend befanden sich gleichermaßen Tumoren auf der Höhe der Dornfortsätze im Bereich des 4. bis 6. Brustwirbels (# VII) und an der rechten Thoraxwand (# VIII), wobei es sich hier um das Rezidiv handelte.

Das mediane Tumolvolumen betrug 9,30 cm³ (Varianz 5,81 cm³ bis 11,67 cm³) und das durchschnittliche Tumolvolumen lag bei 8,95 cm³. Eine Übersicht zu den Tumorcharakteristika der Therapiegruppe II befindet sich im Anhang XI, Kapitel 3, **Tabelle 5**, Seite 96.

2. Behandlungszyklen von Therapiegruppe I

Vier von fünf Katzen haben die Therapiezyklen vollständig durchlaufen. Bei einem Patienten (# IV) wurde die Therapie aufgrund eines Gewichtsverlustes von 24 % (Grad III) nach der sechsten Sitzung abgebrochen. Insgesamt wurden 29 Therapiesitzungen mit einer RHT und freiem DOX ausgeführt. Fünf Sitzungen erfolgten mit freiem DOX ohne eine RHT.

3. Toxizität

3.1. Lokale Toxizität

In beiden Therapiegruppen konnte zu keinem Zeitpunkt eine lokale Toxizität in Folge der Hyperthermie-Behandlung beobachtet werden.

Patient # I entwickelte Krusten und Exkoriationen an den Pinnae sowie eine Erosion mit Krusten am rechten Ohr-Grund nach der zweiten Therapiesitzung. Zudem zeigte der Patient hierbei Juckreiz. Nach Aussage des Besitzers zeigte er diese Veränderungen jedes Jahr zur Sommerzeit. Der Patient wurde daraufhin

dermatologisch behandelt und erhielt eine Ektoparasiten-Prophylaxe, woraufhin die Veränderungen abheilten. Der Juckreiz war weiterhin intermittierend zu beobachten. Nach der fünften Therapiesitzung verschlechterten sich die Symptome wieder und es wurde eine neue dermatologische Behandlung gestartet.

3.2. Systemische Toxizität

3.2.1. Therapiegruppe I

Es gab bei allen Patienten aus Therapiegruppe I keinen Hinweis auf eine kumulative kardiale sowie renale Toxizität, die bei Katzen bei einer klassischen Chemotherapie mit DOX beobachtet werden kann.

Alle fünf Patienten zeigten unter Therapie eine milde Anämie (# I, II, III, IV, V Grad I), die sich bei drei Patienten nach der Therapie wieder normalisierte (# I, III, V) und bei dem Patienten # II und # IV noch bei der Abschlussuntersuchung bestand. Bei zwei Patienten (# IV, V) wurde eine Neutropenie Grad I dokumentiert. Patient # V zeigte zweimalig eine Neutropenie sowie einmalig eine Leukopenie (Grad I). Patient # IV zeigte bereits vor der Behandlung zu der ersten PET-MRT-Untersuchung eine Neutropenie Grad I sowie milde Leukopenie. Eine Leukopenie (Grad I) war ebenfalls unter der Therapie bei diesem Patienten zu beobachten, zweimalig wurde auch eine Leukopenie Grad II dokumentiert, die neutrophilen Granulozyten waren hierbei entweder erniedrigt (Grad I) oder befanden sich im unteren Referenzbereich. Zudem entwickelte sich ab der vierten Sitzung eine moderate Lymphopenie (Grad II). Die Lymphozyten befanden sich bei der Kontrolle nach der sechsten Sitzung wieder im Referenzbereich. Bei nachfolgenden Blutbildkontrollen befanden sich die neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten sowie Gesamtleukozyten weiterhin unterhalb oder im unteren Referenzbereich. Patient # III zeigte einmalig eine Leukopenie (Grad I) unter der Therapie sowie vor der Therapie. Die neutrophilen Granulozyten befanden sich dabei einmalig im unteren Referenzbereich. Eine geringgradige Leukozytose wurde intermittierend bei dem Patienten # I beobachtet, die neutrophilen Granulozyten hatten teilweise einen höheren Wert im Vergleich zu den anderen Messungen, befanden sich aber noch innerhalb des Referenzbereiches. Der Patient zeigte zudem bereits vor Beginn der Therapie eine Eosinophilie sowie intermittierend während der Therapie eine Monozytose. Bei der Blutbilduntersuchung im Rahmen der letzten PET-MRT-Untersuchung bestand weiterhin die Eosinophilie, die Gesamtleukozyten und

Monozyten befanden sich wieder im Referenzbereich. Bei dem Patienten # II wurde eine Leukozytose beobachtet sowie bei der Abschlussuntersuchung eine Neutrophilie. Eine Monozytose und Eosinophilie bestanden ebenfalls.

Eine Thrombozytopenie konnte bei zwei Patienten (# III Grad I, # IV Grad II) beobachtet werden. Bei dem Patienten # III war sie intermittierend und wurde auch schon vor Therapiebeginn dokumentiert. Bei den letzten beiden Therapiezyklen und der Abschlussuntersuchung konnte keine Thrombozytopenie mehr festgestellt werden. Bei dem Patienten # IV trat die Thrombozytopenie nach der zweiten Sitzung auf und normalisierte sich wieder bis zur fünften Sitzung.

Es konnte bei dem Patienten # IV ein milder erniedrigter Harnstoffwert intermittierend festgestellt werden, der sich zum Ende der Behandlungen wieder normalisiert hat und auch bei den Nachkontrollen nach Abschluss der Therapie im Referenzbereich lag. Das Kreatinin befand sich im Referenzbereich. Dieser Patient zeigte zudem nach der vierten Sitzung Symptome in Form einer Übelkeit mit einer erhöhten Salivation (Grad II) und Erbrechen (Grad I) sowie eine Diarrhoe (Grad I). Diese Symptome besserten sich unter einer symptomatischen Therapie, jedoch kam es im weiteren Verlauf zu einer Anorexie (Grad I). Zusammen mit dem damit verbundenen Gewichtsverlust von 24 % wurde die weitere Therapie abgebrochen. Die Symptome waren eine Woche nach Abbruch der Therapie nicht mehr zu beobachten.

Bei allen Patienten wurde ein Gewichtsverlust unter Therapie beobachtet (# I 6,7 % Grad I, # II 10,1 % Grad II, # III 26,1 % Grad III, # IV 24 % Grad III, # V 9,1 % Grad I). Bei dem Patienten # I war bekannt, dass er jedes Jahr zur Sommerzeit bei hohen Temperaturen eine reduzierte Futteraufnahme zeigt. Als der Gewichtsverlust durch eine verminderte Futteraufnahme dokumentiert wurde, lag sehr warmes Wetter vor. Bei dem Patienten # III wurde bei der Eingangsuntersuchung für die Studienteilnahme eine Hyperthyreose festgestellt, die trotz mehrmaliger Therapieansätze nicht eingestellt werden konnte. Es zeigte sich ein Gewichtsverlust trotz normaler Futteraufnahme bis zur fünften Therapiesitzung. Anschließend zeigte sich eine Hyporexie, die mit einer symptomatischen Therapie behoben werden konnte. Bei diesem Patienten wurden noduläre Veränderungen in der Lunge in der letzten PET-MRT-Untersuchung detektiert, die für Lungenmetastasen sprachen. Eine Probenentnahme erfolgte nicht.

Diagramme zu den einzelnen Laborparametern befinden sich im Anhang XI, Kapitel 7, **Abbildung 15** bis **Abbildung 22**, Seite 103 bis 110.

Bei dem Patienten # I (siehe **Abbildung 4**) konnte ein Ausfall der Sinushaare nach der dritten Therapiesitzung beobachtet werden, was auf die DOX-Therapie zurückzuführen ist.



Abbildung 4: Ausfall der Sinushaare bei dem Patienten # I.

3.2.2. Therapiegruppe II

Drei von sechs Patienten zeigten eine milde Anämie (# VII, X, XI, Grad I) nach der Therapie. Patient # VII erhielt freies DOX und Patient # X und # XI DPPG₂-TSL-DOX. Bei dem Patienten # VI, der freies DOX im Rahmen der Therapie erhielt, wurde eine moderate Anämie (Grad II) festgestellt. Dieser Patient zeigte bereits vor der Therapie eine milde Anämie. Es wurde zudem ein erniedrigter Hämoglobinwert (Grad I) nach der Therapie beobachtet. Bei einer weiteren Kontrolle im Rahmen der strahlentherapeutischen Behandlung sind der Hämatokrit und das Hämoglobin angestiegen, befanden sich aber immer noch unterhalb des Referenzbereiches.

Bei den Patienten # IX und # X lag eine milde Leukopenie (Grad I) vor. Bei dem Patienten # IX konnte zusätzlich ein Abfall der neutrophilen Granulozyten in den unteren Referenzbereich verzeichnet werden. Sowohl die Leukopenie als auch die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im unteren Referenzbereich zeigte sich bereits bei der Voruntersuchung. Der Patient # X zeigte die milde Leukopenie bei einer normalen neutrophilen Granulozytenanzahl. Bei dem Patienten # XI wurde hingegen eine geringgradige Leukozytose beobachtet. Bei diesem Patienten sind die neutrophilen Granulozyten nach der Therapie angestiegen und lagen im oberen Referenzbereich. Zudem zeigte sich eine Monozytose. Eine geringgradige Thrombozytose lag ebenfalls vor. Patient # IX zeigte eine milde Thrombozytopenie (Grad I).

Bei fünf Patienten konnte ein Gewichtsunterschied in Form einer Reduktion zu der Voruntersuchung bei der einmaligen Therapiebehandlung mit einer anschließenden radikalen Operation des Tumors festgestellt werden (# VI 13,8 % Grad II, # VII 0,8 % Grad I, # VIII 4,4 % Grad I, # X 4,8 % Grad I, # XI 7,2 % Grad I). Die Nachkontrolle sieben Tage nach der Therapie wurde bei dem Patienten # IX bei dem Haustierarzt vollzogen.

Eine Übersichtstabelle zu den Laborparametern ist im Anhang XI, Kapitel 7, **Tabelle 8**, Seite 111 bis 112, zu finden.

4. Abschlussuntersuchung der Therapiegruppe I

In der letzten PET-MRT-Untersuchung nach Abschluss der Therapiezyklen wurden bei dem Patienten # III noduläre Veränderungen in der Lunge detektiert, die für das Vorliegen von Lungenmetastasen sprachen. Eine Beprobung erfolgte nicht. Aufgrund des Befundes wurde bei diesem Patienten keine weitere Therapie in Form einer Operation und anschließenden Strahlentherapie durchgeführt. Außerdem wurde bei diesem Patienten bei der Abschlussuntersuchung eine asymptomatische bakterielle Zystitis mit *Enterococcus faecialis* festgestellt, woraufhin der Patient eine antibiotische Therapie mit Synulox® (Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) erhalten hat.

Im Serumprofil von Patienten # V zeigte sich bei der Abschlussuntersuchung ein mild erhöhter Harnstoffwert sowie Eiweiß im Urin. Das Protein/Kreatinin-Verhältnis war im Referenzbereich und die sonographische Untersuchung der Nieren unauffällig. Bei weiteren Blutbildkontrollen befand sich der Harnstoffwert wieder im Referenzbereich. Bei diesem Patienten wurde zudem eine weitere Umfangsvermehrung in der rechten Kniefalte, im Bereich der Narbe von der Primärtumorentfernung, in der letzten PET-MRT-Untersuchung detektiert. Diese Umfangsvermehrung wurde bei der chirurgischen Exzision des therapierten Tumors ebenfalls entfernt. Der pathohistologische Befund ergab ein Fibrosarkom.

5. Tumoransprechen der Therapiegruppe I

Vier (# I, II, III, V) der insgesamt fünf Studienpatienten durchliefen den vollständigen Therapiezyklus. Drei Patienten (# I, II, III) zeigten eine progressive Erkrankung. Bei dem Patienten # I wurde eine Volumenzunahme des Tumors um 187,18 % verzeichnet, bei dem Patienten # II um 55,61 % und bei dem Patienten

III um 67,43 %. Patient # III entwickelte zudem unter der Therapie noduläre, im dritten PET-MRT Radiopharmakon-anreichernde Veränderungen in der Lunge, die für das Vorliegen von Lungenmetastasen sprachen. Die Umfangsvermehrungen wurden nicht beprobt. Bei einem Patienten (# IV) war eine stabile Erkrankung mit einer Volumenreduktion von 26,81 % zu verzeichnen. Der letzte Patient (# V) zeigte zwar eine partielle Remission des therapierten Rezidivs, da eine Reduktion des Volumens um 51,82 % zu verzeichnen war, jedoch konnte bei diesem Patienten bei der zweiten Therapiesitzung ein tastbarer Ausläufer nach kaudal festgestellt werden sowie bei der dritten Sitzung eine zweite Umfangsvermehrung circa 0,5 cm von dem ersten Rezidiv entfernt. Die zweite Umfangsvermehrung reichte im PET-MRT Radiopharmakon an. Es erfolgte keine Probenentnahme. Zudem wies dieser Patient nach der letzten Therapiesitzung eine weitere Umfangsvermehrung 6 cm kaudal des ersten Rezidivs auf. Diese Umfangsvermehrung reichte ebenfalls Radiopharmakon im PET-MRT an und wurde zusammen mit dem ersten Rezidiv und der unmittelbar benachbarten zweiten Umfangsvermehrung chirurgisch entfernt sowie pathohistologisch beurteilt. Es handelte sich hierbei ebenfalls um ein Fibrosarkom und demnach könnte eine sogenannte Satellitenmetastase oder ein neuer Primärtumor vorgelegen haben. Eine direkte Verbindung zu dem therapierten Rezidiv über einen Ausläufer konnte in der Bildgebung nicht detektiert werden.

Eine Übersicht zu dem Tumoransprechen der Therapiegruppe I befindet sich im Anhang XI, Kapitel 2, **Tabelle 4**, Seite 95.

Zusammengenommen wurde eine Tumorumfangszunahme um 310,22 % und eine Tumorumfangsreduktion um 78,63 % verzeichnet (siehe **Abbildung 5**).

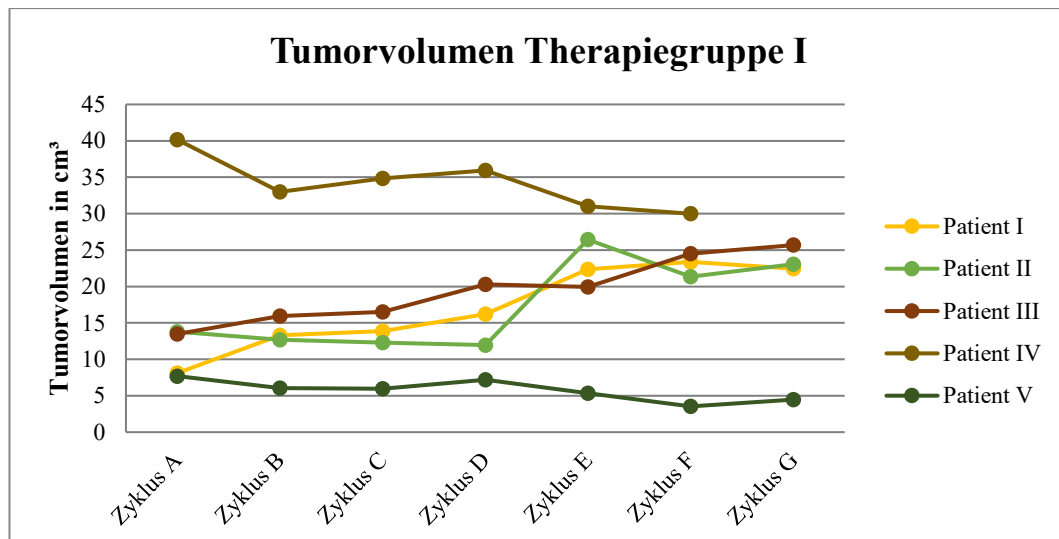


Abbildung 5: Veränderung des Tumolvolumens unter Therapie in Therapiegruppe I, 1,0 mg/kg freies DOX. Patient # IV brach die Therapie wegen eines Gewichtsverlustes von 24 % ab.

6. Hyperthermie

6.1. Therapiegruppe I

T_{50} beschreibt die während der Hyperthermie median gemessene Temperatur im Tumor und T_{90} die Temperatur, die in 90 % der Fälle erreicht oder überschritten wurde (OLESON et al. 1993). Insgesamt betrug T_{50} 41,9 °C (Varianz 41,7 °C bis 41,9 °C) und T_{90} 41,6 °C (Varianz 41,4 °C bis 41,8 °C). Die Werte beziehen sich auf alle Therapiesitzungen von allen Patienten. Die Hyperthermie-Daten der Therapiegruppe I wurden von Dr. Michael Peller ausgewertet. Die Auswertung ist im Anhang XI, Kapitel 6, **Abbildung 13**, Seite 101, zu finden.

Für die Erwärmung des Tumors auf die Zieltemperatur wurde eine Zeit von median 5,8 Minuten (Varianz 4,7 Minuten bis 8,4 Minuten) gebraucht. Die „Calculated equivalent minutes“ (CEM_{43}) betrugen bei den Patienten # I, # II, # III, # IV, # V insgesamt 81,8 Minuten.

6.2. Therapiegruppe II

T_{50} betrug bei allen Patienten median 41,9 °C (Varianz 41,9 °C bis 42,0 °C) und T_{90} 41,8 °C (Varianz 41,4 °C bis 41,9 °C). Die Zeit bis zum Erreichen der Zieltemperatur betrug median 7 Minuten (Varianz 5 Minuten bis 8 Minuten) und die CEM_{43} der Gesamtheit aller Patienten 13,8 Minuten. Die Hyperthermie-Daten der Therapiegruppe II wurden von Dr. Michael Peller ausgewertet. Die Auswertung

ist im Anhang XI, Kapitel 6, **Abbildung 14**, Seite 102, zu finden.

7. Pharmakokinetik

Bei der Therapiegruppe I wurde die Pharmakokinetik des freien DOX ohne eine RHT sowie unter dessen Einfluss bestimmt. Die Hyperthermie-Anwendung erfolgte über eine Zeitspanne von 60 Minuten.

Bei dem Patienten # I konnte zum Zeitpunkt 7 Minuten und 15 Minuten bei der ersten Therapiesitzung ohne Hyperthermie kein Blut gewonnen werden, da der periphere Venenverweilkatheter erneuert werden musste.

Die Halbwertszeit t_{α} beschreibt den größten Abfall der DOX- Konzentration und erfolgte innerhalb von median 4,9 Minuten (Varianz 4,1 Minuten bis 5,6 Minuten) ohne eine Hyperthermie und median 4,3 Minuten (Varianz 3,4 Minuten bis 5,3 Minuten) mit einer Hyperthermie nach Beendigung der Applikation von freiem DOX. Danach folgt eine verlängerte zweite Eliminationshalbwertszeit t_{β} .

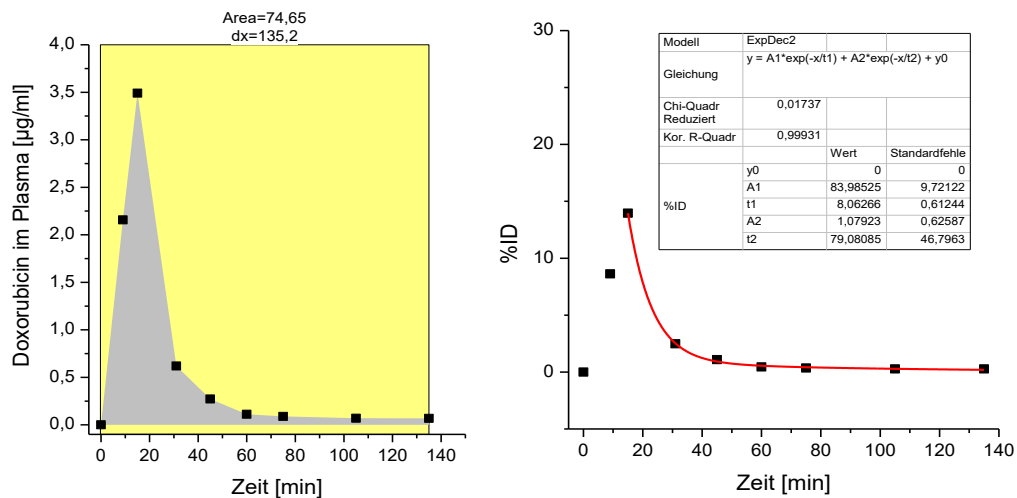


Abbildung 6: Pharmakokinetik des freien DOX ohne Hyperthermie bei dem Patienten # IV.

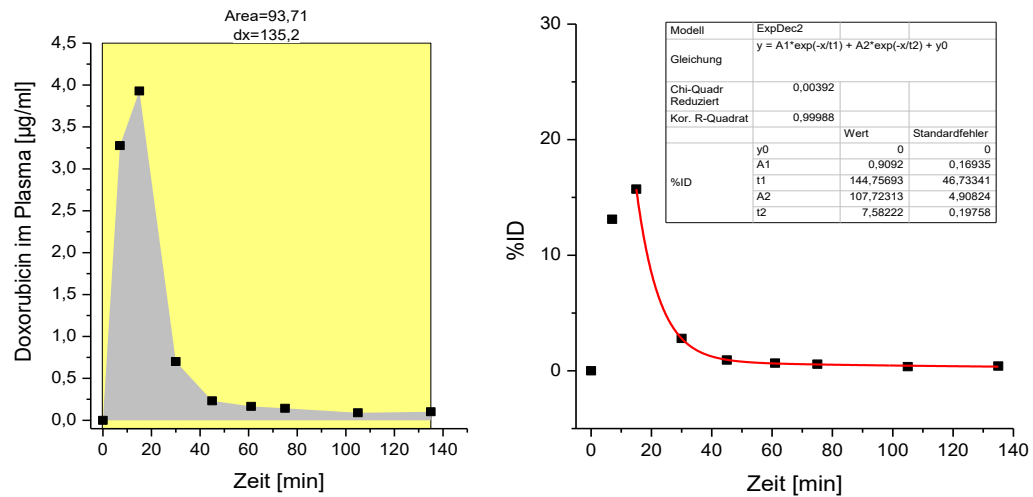


Abbildung 7: *Pharmakokinetik des freien DOX mit Hyperthermie bei dem Patienten #IV.*

Die AUC_{0-135} betrug ohne eine Hyperthermie median 44,09 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$ (Varianz 32,94 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$ bis 74,65 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$) und mit einer Hyperthermie median 52,19 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$ (Varianz 37,82 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$ bis 93,71 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$).

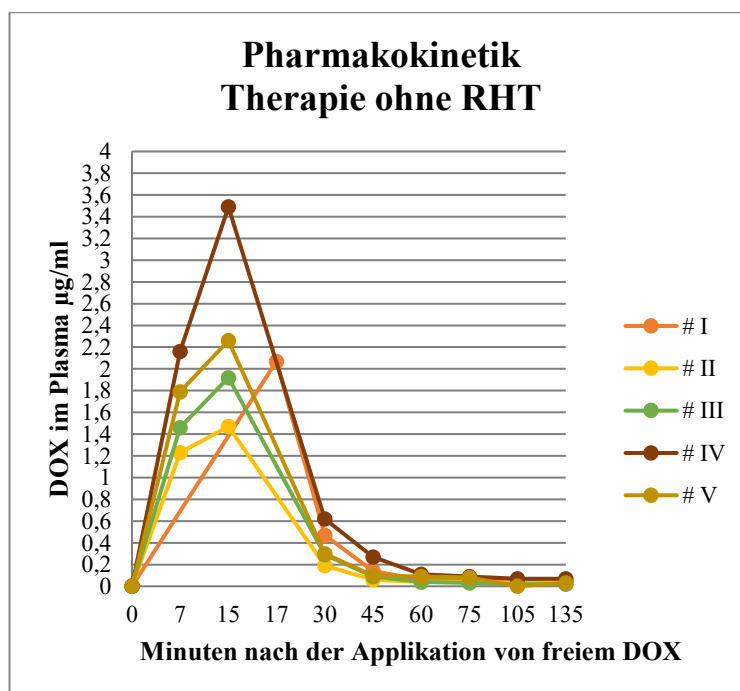


Abbildung 8: *Pharmakokinetik von freiem DOX bei allen Patienten ohne RHT.*

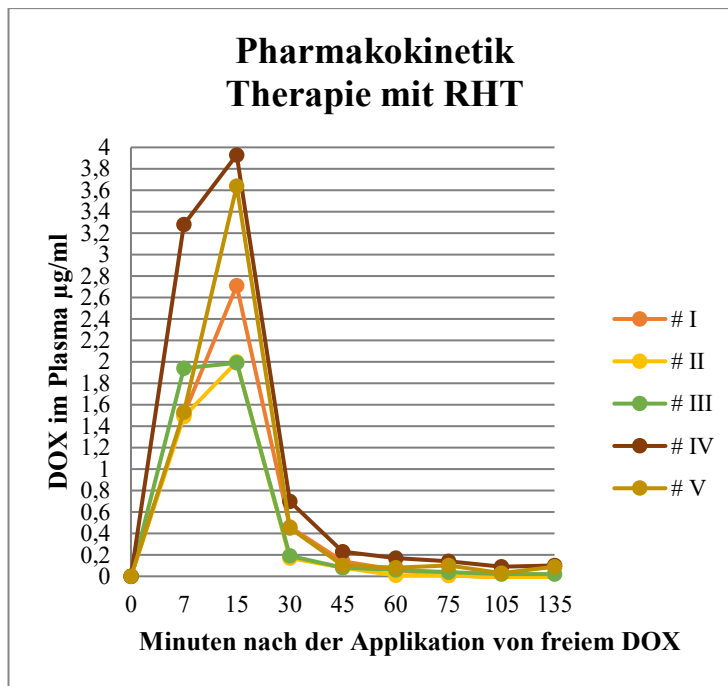


Abbildung 9: Pharmakokinetik von freiem DOX bei allen Patienten mit RHT.

8. DOX-Konzentration im Tumorgewebe von Therapiegruppe II

Bei der Therapiegruppe II wurde die DOX-Konzentration im Tumorgewebe nach der Anwendung von freiem DOX oder DPPG₂-TSL-DOX bei jeweils drei Patienten mit einer simultanen RHT bestimmt. Es zeigte sich eine 3,4-fach höhere Anreicherung von DOX im Tumorgewebe bei der Applikation von DPPG₂-TSL-DOX im Vergleich zu freiem DOX (siehe **Tabelle 1**).

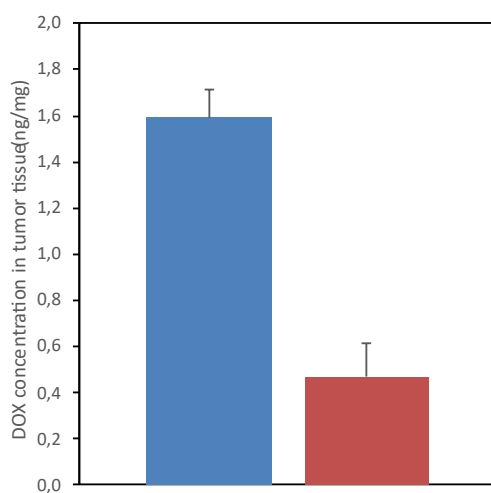


Abbildung 10: DOX-Konzentration im Tumorgewebe von DPPG₂-TSL-DOX (blau) und freiem DOX (rot) im Vergleich.

Freies DOX			DPPG ₂ -TSL-DOX	
C _{DOX} im Tumor (ng/mg)	S.D. (ng/mg)	Anreicherungsfaktor (TSL/freies DOX)	C _{DOX} im Tumor (ng/mg)	S.D. (ng/mg)
0,47	0,15	3,4	1,59	0,12

Tabelle 1: Bestimmung der DOX-Konzentration im Tumorgewebe bei der Applikation von freiem DOX und DPPG₂-TSL-DOX mit einer simultanen RHT.

9. Weiterführende Therapie nach Abschluss der Behandlungszyklen

9.1. Therapiegruppe I

Bei vier (# I, II, IV, V) der fünf Studienpatienten wurde der Tumor chirurgisch entfernt. Der neue Primärtumor oder die Satellitenmetastase bei dem Patienten # V wurde ebenfalls reseziert. Die histologische Untersuchung ergab hierbei ein Fibrosarkom. Im Anschluss erhielten die Patienten # I, # II und # IV eine definitive Strahlentherapie in 15 Sitzungen zu je 2,5 Gy. Bei dem Patienten # V, der zum Ende der Therapie eine Satellitenmetastase oder neuen Primärtumor aufwies, wurde eine palliative Strahlentherapie in fünf Sitzungen zu je sechs Gray durchgeführt. Patient # III erhielt aufgrund der Detektion von Lungenmetastasen weder eine chirurgische Resektion noch eine anschließende Strahlentherapie. Eine Zusammenfassung zu der weiterführenden Therapie befindet im Anhang XI, Kapitel 4, **Tabelle 6**, Seite 97.

9.2. Therapiegruppe II

Bei allen Patienten (# VI, VII, VIII, IX, X, XI) wurde der Tumor direkt nach Abschluss der Therapie chirurgisch entfernt. Anschließend erhielten fünf von sechs Patienten (# VI, VII, IX, X, XI) eine definitive Strahlentherapie in 15 Sitzungen zu je 2,5 Gy. Bei dem Rezidiv (# VIII) wurde ein palliatives Protokoll in fünf Sitzungen zu je sechs Gray gewählt, da der Primärtumor zuvor bereits mit einem definitiven Protokoll bestrahlt wurde. Eine Zusammenfassung zu der weiterführenden Therapie befindet sich im Anhang XI, Kapitel 4, **Tabelle 7**, Seite 98.

10. Follow-up der Therapiegruppe I

Patient # I entwickelte vier Monate nach der definitiven Strahlentherapie eine Umfangsvermehrung an der linken Thoraxwand, im Axillarbereich, außerhalb des Strahlenfeldes. Die zytologische Untersuchung ergab den Verdacht auf ein Fibrosarkom. Eine weiterführende Diagnostik und Behandlung wurden von dem Besitzer nicht gewünscht. Zehn Tage nach der zytologischen Diagnosestellung der Umfangsvermehrung im Axillarbereich ist Patient # I aufgrund einer unbekannten akuten Atemnot auf dem Weg in eine Tierklinik verstorben. Bei diesem Patienten wurden im Rahmen der chirurgischen Fibrosarkom-Entfernung fünf Rippen reseziert. Ein Trauma der Lunge konnte seitens des Besitzers nicht ausgeschlossen werden. Eine Progression des Tumorrezidivs sowie späte Nebenwirkungen in Form einer Fibrose des Lungengewebes infolge der definitiven Strahlentherapie können auch als mögliche Ursachen in Betracht gezogen werden. Eine pathologische Untersuchung post mortem erfolgte nicht. Patient # II zeigte sechs Monate nach der definitiven Strahlentherapie eine Paraplegie und wurde von dem Haustierarzt aufgrund eines Aorten-Thrombus euthanasiert. Zuvor wurde dieser Patient mit einer Uveitis vorstellig, die mit Prednisolon lokal und systemisch sowie einem Antibiotikum behandelt wurde. Eine postmortale Untersuchung wurde nicht durchgeführt. Es gab bis zu diesem Zeitpunkt keinen Hinweis auf ein Rezidiv. Dieser Patient zeigte außerdem bei der Eingangsuntersuchung eine noduläre Verschattung in den Röntgenbildern der Lunge. Diese Verschattung wurde während und nach der Therapie kontrolliert und zeigte keine Veränderung. Eine Probenentnahme zum Ausschluss einer Metastase erfolgte nicht. Patient # III verstarb 1,5 Monate nach der dritten PET-MRT-Untersuchung. Bei diesem Patienten wurden in der letzten Bildgebung und dem Re-Staging Lungenmetastasen detektiert, weshalb keine chirurgische Exzision des Tumors und keine anschließende Strahlentherapie erfolgten. Der Besitzer hatte weitere Kontrolltermine zur Überwachung des Allgemeinzustandes des Patienten abgelehnt. Bei dem Patienten # IV bestand 21 Monate nach der chirurgischen Exzision und der anschließenden definitiven Strahlentherapie kein Hinweis auf ein Rezidiv. Sechs Monate nach der definitiven Strahlentherapie wurde eine Ataxie bei dem Patienten # IV festgestellt, die sich über die Zeit nicht verschlechtert hat und den Patienten in seinem Allgemeinbefinden nicht beeinträchtigte. Da die Strahlentherapie im Rückenmarksbereich erfolgte, ist diese Nebenwirkung als

wahrscheinliche Spätfolge der Strahlentherapie anzusehen. Vier Monate nach der palliativen Strahlentherapie zeigte Patient # V bei dem regulären Kontrolltermin eine Umfangsvermehrung im Bereich der rechten Kniefalte, am kaudalen Nahtende des Operationsfeldes des Fibrosarkoms. Die zytologische Untersuchung ergab ein Sarkom. Im weiteren Verlauf zeigte der Patient eine deutlich reduzierte Futteraufnahme, weshalb weitere Untersuchungen durchgeführt wurden. In dem Röntgen der Lunge in drei Ebenen war eine weichteildichte Verschattung mit einem Durchmesser von einem Zentimeter zu beobachten. Eine Lungenmetastase konnte nicht ausgeschlossen werden. Patient # V wurde von dem praktizierenden Tierarzt aufgrund der Anorexie und dem damit verbundenen Gewichtsverlust sowie aufgrund einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens sechs Monate nach der palliativen Strahlentherapie euthanasiert.

V. DISKUSSION

Durchführbarkeit

Die Anwendung einer Kombinationstherapie aus der Applikation von sowohl freiem DOX und einer simultanen RHT als auch thermosensitivem liposomalen DOX (DPPG₂-TSL-DOX) mit einer simultanen RHT bei Katzen mit feline Fibrosarkomen war gut ausführbar. Dies zeigten bereits vorangegangene Studien (ZIMMERMANN 2014, TROEDSON 2015). In der vorliegenden Studie wurden nur Patienten mit Tumoren eingeschlossen, deren Größe eine vollständige Ankopplung des Applikators des Hyperthermie-Gerätes ermöglichten, wodurch eine homogenere Tumorerwärmung im Vergleich zu der Studie von Zimmermann und Troedson erzielt werden kann. In diesen Studien passte der Tumor bei einigen Patienten aufgrund der Größe nicht vollständig unter den Applikator, was eine Limitation darstellte (ZIMMERMANN 2014, TROEDSON 2015). Bei Zimmermann et al. wurde eine ausgedehnte Nekrose in dem Tumorbereich beobachtet, der sich in der Nähe des Applikators befand. Auf der gegenüberliegenden Seite, die am weitesten von dem Applikator entfernt lag, verblieben vitale Spindelzellen, was auf eine unzureichende Erwärmung hinwies und mit der Eindringtiefe des Applikators korrelierte (ZIMMERMANN et al. 2017). Da die Therapieoptionen für inoperable feline Fibrosarkome limitiert sind und diese durchaus ein großes Tumolvolumen haben können, wären Applikatoren in verschiedenen Größen sinnvoll, um eine homogene Erwärmung zu erzielen.

In der aktuellen Studie wurden Temperaturen für T₉₀ in dem Bereich von 41,4 °C bis 41,8 °C erreicht und für T₅₀ von 41,7 °C bis 42,0 °C (Übersicht Anhang XI, Kapitel 6, **Abbildung 13** und **Abbildung 14**, Seite 101 bis 102). Eine Temperatur bei der DPPG₂-TSL-DOX eine optimale wärmeinduzierte Freisetzung von DOX *in vitro* (HOSSANN et al. 2012) und *in vivo* (WILLERDING et al. 2016) zeigt. Bei den drei Studienpatienten, die DPPG₂-TSL-DOX erhielten, war somit eine Freisetzung des DOX aus den TSL in dem Tumor gegeben. Die in der vorliegenden Studie aufgezeichneten einzelnen Temperaturen der intratumoralen Sonde, die während der 60-minütigen Hyperthermie-Sitzung aufgezeichnet wurden und in der Übersicht im Anhang XI, Kapitel 6, **Abbildung 13** und **Abbildung 14**, Seite 101 bis 102, zu finden sind, sprechen für eine gute Qualität der durchgeführten

Hyperthermie-Behandlung (OLESON et al. 1993, BRUGGMOSER et al. 2012). Tumorgewebe ist jedoch sehr heterogen. Es gibt Unterschiede in der Wärmeleitung und Tumorperfusion, wodurch davon ausgegangen werden muss, dass bei der Verwendung einer zentralen intratumoralen Temperaturmesssonde die entlang des Sonden-Kanals erhobenen Daten nicht für den gesamten Tumor sprechen (LANDON et al. 2011). Unter Verwendung mehrerer intratumoraler Temperaturmesssonden könnte die Beurteilung der Wärmeverteilung im gesamten Tumor verbessert werden. Eine gute Methode stellt die nicht invasive Temperaturmessung mittels MRT dar. Sie ermöglicht eine präzise Beurteilung der Wärmeverteilung in dem gesamten Tumolvolumen. Hierzu wurden bereits MRT-Hyperthermie-Hybridsysteme entwickelt (BAUR et al. 2003). Diese MRT-Temperaturkontrolle wird unter anderem bei MRT/HIFU-Systemen (Magnetresonanz-gesteuerter hochintensiver fokussierter Ultraschall) eingesetzt und kann als nichtinvasives Hyperthermie-Gerät zur lokalen Erwärmung von vor allem tiefliegendem Gewebe genutzt werden (SEBEKE et al. 2021, SEBEKE et al. 2022). Eine begleitende MRT-Messung könnte auch mit einer simultanen Gabe von in TSL eingeschlossenen MRT-Kontrastmitteln zur Visualisierung der intratumoralen DOX-Verteilung im Sinne einer Chemodosimetrie eingesetzt werden (PELLER et al. 2016).

Systemische Toxizität

Es wurden milde bis moderate systemische Nebenwirkungen mit Ausnahme von dem Patienten # III und # IV, die einen Gewichtsverlust Grad III zeigten, festgestellt, die nicht alle unmittelbar mit der Therapie mit freiem DOX assoziiert werden konnten.

Bei der Mehrheit der Patienten aus Therapiegruppe I konnte eine Erniedrigung der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte in Form einer milden regenerativen, aber auch mikrozytären aregenerativen Anämie (Grad I - II) beobachtet werden. Auch in Therapiegruppe II war dies zu beobachten. Ein beginnender Abfall der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte konnte bereits nach den Voruntersuchungen und bei der ersten Narkose für die Bildgebung (MRT, PET-MRT, CT) festgestellt werden. Aufgrund der Heinz-Body-Anämie, die das Anästhetikum Propofol bewirken kann, wurde für die Einleitung der Narkosen für die einzelnen Therapiesitzungen in dieser Studie das Anästhetikum Alfaxalon verwendet. Es wurden jedoch keine Untersuchungen ausgewertet, um Nebenwirkungen wie eine Heinz-Body-Anämie

bei Alfaxalon zu detektieren. Die Lebensdauer von Erythrozyten bei der Katze beträgt etwa 90 Tage, weshalb ein Abfall der Erythrozyten als myelosuppressiver Effekt des freien DOX nicht so früh zu erwarten ist. Bei keinem der Patienten gab es einen Hinweis auf eine Blutung oder Hämolyse. Ein Eisenmangel durch die chronische Erkrankung kann einen weiteren Faktor darstellen. Durch die vielen Blutprobenentnahmen im Rahmen der pharmakokinetischen Messungen in Therapiegruppe I kann ein iatrogener Abfall der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte als Ursache in Betracht gezogen werden sowie die radikale chirurgische Exzision des Tumors in Therapiegruppe II direkt im Anschluss an die Therapie. Keiner der Patienten aus Therapiegruppe I und II zeigte klinische Symptome infolge der Anämie. Bei der Abschlussuntersuchung von Therapiegruppe I befand sich bei drei Patienten (# I, II, V) der Hämatokritwert wieder im Referenzbereich. Bei dem Patienten # IV stieg bei weiteren Kontrollen der Hämatokritwert bis knapp unterhalb des Referenzbereiches an. Weitere Blutbildkontrollen bei dem Patienten # II wurden von dem Haustierarzt nicht übermittelt. In der Therapiegruppe II bestand in der ultrasonographischen Untersuchung (# VI) und CT-Untersuchung (# XI) bei zwei Patienten der Verdacht auf eine Nephropathie. Es wurde zu einer Abklärung geraten. Patient # VI zeigte bereits vor der einmaligen Therapiesitzung einen Abfall des Hämatokritwertes. Eine Beteiligung einer möglichen Nephropathie am Hämatokrit-Abfall kann nicht ausgeschlossen werden. Patient # VI, bei dem eine moderate Anämie (Grad II) festgestellt wurde, zeigte in einer weiteren Kontrolle einen Anstieg des Hämatokrit- und Hämoglobinwertes, jedoch lagen beide Werte weiterhin unterhalb des Referenzbereiches.

Eine Leukopenie wurde bei drei Patienten (# III Grad I, # IV Grad I - II, # V Grad I) aus der Therapiegruppe I beobachtet und war bei den Patienten # III und # V einmalig unter Therapie zu verzeichnen. Die neutrophilen Granulozyten waren bei dem Patienten # V hierbei ebenfalls erniedrigt (Grad I) und ein weiteres Mal unter der Therapie bei einer Gesamtleukozytenzahl im unteren Referenzbereich. Patient # III und # IV zeigten die Leukopenie bereits vor Therapiebeginn. Bei dem Patienten # III befanden sich bei der einmaligen Leukopenie während der Therapie die neutrophilen Granulozyten im unteren Referenzbereich. Patient # IV zeigte während der Therapie mehrmals eine Leukopenie Grad I und eine Leukopenie Grad II nach der vierten und sechsten Therapiesitzung. Die neutrophilen Granulozyten befanden sich entweder im unteren Referenzbereich oder es lag eine Neutropenie

Grad I vor. Zudem entwickelte sich ab der vierten Sitzung eine moderate Lymphopenie. Eine prophylaktische Antibiotikagabe war nicht notwendig, da die neutrophilen Granulozyten zu keinem Zeitpunkt so stark abgefallen sind, dass eine Sepsis-Gefahr bestand. Auch eine Dosisreduktion des DOX war nicht notwendig. Bei dem Patienten # III wurde aufgrund der Detektion einer Hyperthyreose in der Voruntersuchung eine Therapie mit Vidalta® (Intervet Deutschland GmbH, ein Unternehmen der MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Deutschland) gestartet. Der Patient zeigte eine Leukopenie als Nebenwirkung auf das Medikament, womit sich die erniedrigte Gesamtleukozytenzahl vor dem Therapiebeginn erklären lässt. Das Medikament musste abgesetzt werden. Bei den beiden Patienten (# III, V), die einmalig eine Leukopenie unter der Therapie mit einer Erniedrigung der neutrophilen Granulozyten in den unteren Referenzbereich (# III) und unterhalb des Referenzbereiches (# V, Grad I) zeigten, normalisierten sich die Werte bei der nächsten Kontrolle. Patient # IV zeigte bereits vor dem Therapiebeginn zu der PET-MRT-Untersuchung eine Leukopenie (Grad I) mit einer Neutropenie Grad I und nach der zweiten Sitzung bei den weiteren Therapien eine Neutropenie Grad I sowie zweimalig eine Leukopenie Grad II. Bei der Eingangsuntersuchung für die Studienaufnahme lag eine Thrombozytopenie Grad I vor, die anderen Untersuchungen waren unauffällig. Auch in weiteren Untersuchungen nach Abschluss der Therapie konnte die Leukopenie und Neutropenie beobachtet werden. Eine zusätzliche Myelosuppression durch freies DOX während der Therapie kann nicht ausgeschlossen werden, da unter Therapie auch eine Lymphopenie und Thrombozytopenie ermittelt werden konnte. Der Patient # IX aus der Therapiegruppe II zeigte nach der einmaligen Therapie eine Leukopenie (Grad I) mit einem Abfall der neutrophilen Granulozyten in den unteren Referenzbereich. Dies war bereits bei der Voruntersuchung zu beobachten. Nach 13 Tagen waren diese Auffälligkeiten nicht mehr nachzuvollziehen und traten bei der Kontrolluntersuchung nach der einmaligen Therapie wieder auf. Eine milde Thrombozytopenie wurde ebenfalls dokumentiert. Weitere Blutbildkontrollen wurden von dem Haustierarzt nicht übermittelt.

Der Patient # I zeigte während und auch schon vor der Therapie intermittierend eine Leukozytose. Die eosinophilen Granulozyten waren kontinuierlich erhöht und intermittierend die Monozyten. Eine Neutrophilie wurde nicht beobachtet. Die Kotuntersuchung vor Beginn der Therapie war unauffällig. Der Patient wurde zuvor

auch von dem Besitzer entwurmt. Während der Therapie entwickelten sich Krusten und Exkorationen an den Pinnae sowie eine Erosion mit Krusten am rechten Ohr-Grund begleitet von Juckreiz, die der Patient jedes Jahr im Sommer zeigt. Nach einer dermatologischen Behandlung heilten die Veränderungen ab, der Juckreiz blieb intermittieren bestehen und es kam nach der fünften Sitzung zu einem erneuten Auftreten der dermatologischen Symptome. Zudem sind unter den dermatologischen Therapien die eosinophilen Granulozyten etwas abgesunken, befanden sich aber noch oberhalb des Referenzbereiches. Das jährliche Auftreten der dermatologischen Veränderungen zur gleichen Jahreszeit lassen eine Allergie, insbesondere eine Umweltallergie, vermuten. Die Allergie kann ursächlich sein für die Eosinophilie. Bei dem Patienten # II wurde eine Leukozytose mit einer Eosinophilie und Monozytose während der Therapie sowie bei der Abschlussuntersuchung eine Leukozytose mit einer Neutrophilie ohne Linksverschiebung beobachtet. Eine Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl kann auch bei starker Aufregung und Stress beobachtet werden. Hierbei können die neutrophilen Granulozyten im Referenzbereich liegen oder ohne eine Linksverschiebung erhöht sein. Der Patient # XI aus der Therapiegruppe II zeigte ebenfalls eine Leukozytose ohne eine Neutrophilie.

Eine Thrombozytopenie wurde bei zwei Patienten (# III und IV) aus der Therapiegruppe I dokumentiert. Bei dem Patienten # III lag die Thrombozytopenie bereits vor der Therapie vor und trat intermittierend auf. Bei dem Patienten # IV war die Thrombozytopenie nach der zweiten Therapiesitzung bis zur fünften Therapiesitzung zu beobachten. Ein Messfehler könnte in Betracht gezogen werden, da Katzenblut zu Verklumpungen neigt und Thrombozyten-Aggregate gebildet werden können. Der Patient # IV zeigte eine Thrombozytopenie mit Aggregatbildung bereits vor der Therapie. Bei dem Patienten # III könnte auch eine paraneoplastische Thrombozytopenie in Betracht gezogen werden. Sie geht mit einer Progression des Tumors einher, was bei diesem Patienten zusammen mit einer Metastasierung in die Lunge vorlag, jedoch liegt die paraneoplastische Thrombozytopenie über einen längeren Zeitraum vor, hier war die Thrombozytopenie intermittierend zu beobachten. Der Patient # IV zeigte über einen längeren Zeitraum eine Thrombozytopenie, jedoch lag eine stabile Erkrankung und keine Progression des Tumors vor. Eine Myelosuppression des freien DOX kann nicht ausgeschlossen werden, da sich die Thrombozytopenie bis

zur fünften Therapiesitzung von Grad I auf Grad II verstärkte und darüber hinaus weiterhin Thrombozyten-Werte überwiegend im unteren Referenzbereich dokumentiert wurden. Ebenfalls bei dem Patienten # IX aus der Therapiegruppe II wurde eine Thrombozytopenie bei Vorhandensein von Thrombozyten-Aggregaten festgestellt, die für eine Verklumpung des Katzenblutes sprachen, womit das Vorliegen einer falsch niedrigen Thrombozytenzahl in Betracht gezogen werden kann. Beobachtungen, wie eine Blutung oder disseminierte intravasale Gerinnung, konnten bei den Tieren nicht gemacht werden.

Im Serumprofil des Patienten # IV zeigte sich intermittierend ein erniedrigter Harnstoffwert. Dieser Patient entwickelte gastrointestinale Symptome unter Therapie und zeigte einen Gewichtsverlust Grad III. Bei fehlendem Appetit und einer somit geringeren Proteinaufnahme kann der Harnstoffwert erniedrigt sein. Der Patient # V zeigte hingegen einmalig bei der Abschlussuntersuchung eine Erhöhung des Harnstoffes. Zu dem Zeitpunkt der Blutentnahme war der Patient nicht nüchtern, was ursächlich für einen erhöhten Harnstoff sein kann. Ultrasonographisch waren die Nieren bei beiden Patienten unauffällig und das Kreatinin im Referenzbereich. Bei dem Patienten # V wurde zudem bei der Abschlussuntersuchung Eiweiß im Urin festgestellt. Das Protein/Kreatinin-Verhältnis befand sich im Referenzbereich. Weitere Urinuntersuchungen wurden von dem Haustierarzt nicht übermittelt.

Ein Gewichtsverlust konnte bei allen Patienten in beiden Therapiegruppen beobachtet werden. Mit Ausnahme des Patienten # IX, da hier die Nachkontrolle beim Haustierarzt erfolgte. Bei sechs Patienten war der Gewichtsverlust mild (# I, V, VII, VIII, X, XI), bei zwei Patienten moderat (# II, VI) und zwei Patienten zeigten einen Gewichtsverlust von Grad III (# III, IV). Die vielen Therapiesitzungen und häufigen Termine in Therapiegruppe I stellten für die Katzen eine Stresssituation dar, was sich in einer Gewichtsreduktion widerspiegeln kann. Zudem befanden sich die Patienten # I und # II nicht in ihrer gewohnten Umgebung. Aufgrund der weiten Anfahrt wurden sie bei Personen in der Nähe für den Zeitraum der Therapien untergebracht. Vorberichtlich war bei dem Patienten # I bekannt, dass er jedes Jahr bei warmem Wetter zur Sommerzeit eine reduzierte Futteraufnahme zeigt. Die Therapiesitzungen fanden bei diesem Patienten in diesem Zeitraum statt. Auch die einmaligen Therapiesitzungen in der Therapiegruppe II stellten eine Stresssituation für die Tiere dar. Außerdem wurde

nach der einmaligen Therapiesitzung eine radikale chirurgische Exzision des Tumors durchgeführt, wodurch es in den ersten Tagen nach der Operation zu einer verminderten Futteraufnahme kommt. Bei dem Patienten # III wurde im Rahmen der Voruntersuchung eine Hyperthyreose festgestellt, die sich nicht einstellen ließ. Es wurden drei Therapieansätze mit Medikamenten und Diätfutter versucht. Entweder zeigte der Patient Nebenwirkungen auf die medikamentöse Behandlung mit einem Thyreostatikum oder das Hyperthyreose-Diätfutter wurde aufgrund einer verminderten Akzeptanz durch den Patienten inkonsequent gefüttert oder es war dem Besitzer nicht möglich aufgrund einer Hyporexie des Patienten nach der sechsten Sitzung konsequent einen Betablocker zur Behandlung des Bluthochdrucks zu verabreichen. Durch die Verabreichung von Mirtazapin (Mirtazapin Sandoz[®], Salutas Pharma GmbH, Barleben, Deutschland) zur Anregung des Appetits konnte die Futteraufnahme zeitweilig normalisiert werden. Als mögliche Ursache können die Progression der Tumorerkrankung und die Hyperthyreose in Betracht gezogen werden. Der Gewichtsverlust von 23 % (Grad III) bis zur sechsten Therapiesitzung, trotz normalem Fressverhalten, kann eine Folge der Hyperthyreose sein, die aus den oben genannten Gründen nicht adäquat behandelt werden konnte. Gewichtsverlust bei normalem oder gesteigertem Fressverhalten ist ein häufiges Symptom einer Hyperthyreose. Auch eine Hyporexie kann ein Symptom bei Katzen mit einer Hyperthyreose sein. Stress kann ebenfalls als ein zusätzlicher Auslöser in Betracht gezogen werden. Nach dem Absetzen des Mirtazapin und dem Abschluss der Therapien zeigte der Patient erneut eine anhaltende, geringgradig reduzierte Futteraufnahme. Insgesamt lag nach Abschluss der Therapie ein Gewichtsverlust von 26 % (Grad III) vor. Bei dem Patienten # IV erfolgte ein Therapieabbruch wegen einer Abnahme des Körpergewichts um 24 % (Grad III). Der Patient zeigte gastrointestinale Symptome nach der vierten Therapiesitzung. Diese beinhalteten eine Hyporexie (Grad I), eine moderate Übelkeit mit einer erhöhten Salivation und Erbrechen (Grad I) sowie eine Diarrhoe Grad I. Es ist nicht auszuschließen, dass der verminderte Appetit und die damit verbundene Reduktion der Futteraufnahme ebenfalls auf Stress, der durch die regelmäßigen Tierarztbesuche und intensiven Therapien entstanden ist, zurückzuführen ist. Zur Therapie der Hyporexie ist frühzeitig Mirtazapin (Mirtazapin Sandoz[®], Salutas Pharma GmbH, Barleben, Deutschland) verabreicht worden. Aufgrund einer Unverträglichkeit in Form von Erbrechen nach der Tabletteneingabe, musste das Medikament jedoch abgesetzt werden, weshalb die

Hyporexie bestehen blieb. Sowohl die Übelkeit und das Erbrechen als auch die Kotbeschaffenheit verbesserten sich unter einer Therapie mit Omeprazol (OMEP[®] MUT[®] 10 mg Hexal, Salutas Pharma GmbH, Barleben, Deutschland), Maropitant (Cerenia[®], Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) und einer Diät mit Schonkost (Royal Canin[®] Sensitivity Control Huhn, Royal Canin Tiernahrung GmbH & Co. KG, Köln, Deutschland). Im weiteren Verlauf entwickelte sich eine Anorexie Grad I. Aufgrund des Gewichtsverlustes von 24 % wurde die Therapie bei diesem Patienten abgebrochen. Eine Woche nach dem Abbruch der Therapie waren die oben genannten Symptome nicht mehr zu beobachten, weshalb eine gastrointestinale Toxizität des freien DOX als Ursache in Betracht gezogen werden kann.

Der Patient # I zeigte nach der dritten Therapiesitzung einen Ausfall der Sinushaare. Dies ist als Nebenwirkung von freiem DOX beschrieben und kann als solche angesehen werden.

Die Applikation der thermosensitiven Liposomen bei drei Patienten (# IX, X, XI) aus der Therapiegruppe II wurde gut vertragen. Eine Prämedikation mit Kortikosteroiden und Antihistaminika erfolgte nicht.

Pharmakokinetik und gemessene DOX-Konzentration im Tumor

Freies DOX hat ein hohes Verteilungsvolumen, wodurch es sich schnell aus dem Plasma in das Gewebe umverteilt und deswegen schnell aus dem Plasma eliminiert wird (WANG et al. 2006). Dies zeigt sich in einem logarithmisch-linearen Abfall der DOX-Plasmakonzentration. Hierdurch entsteht eine niedrige Halbwertszeit $t_{0.5}$, eine hohe Rate der Clearance und eine niedrige Fläche der AUC. Durch die entstehende erniedrigte DOX-Konzentration im Plasma diffundiert das DOX entlang seines Konzentrationsgradienten vom Gewebe zurück ins Plasma. Es erfolgt erneut die Elimination aus dem Blutplasma, ausgedrückt über die Eliminationshalbwertszeit t_{β} , die annähernd linear verläuft (ALLEN 2007).

Die höchste DOX-Konzentration wurde zum Zeitpunkt 15 Minuten gemessen, nach Beendigung der DOX-Infusion.

Die in der vorliegenden Studie gemessenen Pharmakokinetik-Parameter für DOX nach Gabe von freiem Wirkstoff ohne Hyperthermie ergaben eine mittlere Halbwertszeit von 4,92 Minuten, eine mittlere (theoretische) maximale

Plasmakonzentration nach Ende der Infusion von 8,98 % und eine mittlere AUC_{0-135} von 48,17 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{min}$, was für die oben diskutierte rasche Umverteilung des Wirkstoffes spricht. Dies bestätigt sich, wenn die Pharmakokinetik-Parameter für DOX mit denen nach Gabe von DPPG₂-TSL-DOX ohne Hyperthermie verglichen werden (TROEDSON 2015). Bei diesen Patienten waren diese um 13,8-fach, 7,8-fach und 28,4-fach höher als bei freiem DOX (HOSSANN et al. 2021).

Liposomales DOX ist hauptsächlich auf das Blutplasma beschränkt, was einem Ein-Kompartiment-Modell entspricht, und diffundiert aufgrund der Größe des Liposoms nur eingeschränkt in andere Gewebekomponenten, wie beispielsweise soliden Tumoren, die eine erhöhte Gefäßpermeabilität aufweisen. In einem Rückenhautkammermodell der Ratte zeigte sich bei fluoreszenzmarkierten DPPG₂-TSL innerhalb von 90 Minuten fast keine Extravasation in den Tumor, die meisten TSL verblieben intravaskulär (HOSSANN et al. 2021). Die Elimination über die Zellen des RES überwiegt gegenüber der Verteilung im Gewebe, bis eine Sättigung erreicht wird (ALLEN 2007). Durch eine PEGylierung der Liposomen kann die Eliminierung verzögert werden (PAPAHADJOPOULOS et al. 1991). Die Elimination und Verteilung des freigesetzten DOX erfolgt gemäß dem bereits beschriebenen Zwei-Kompartiment-Modell (ALLEN 2007).

Es ist beschrieben, dass die thermische Verstärkung von DOX in einer erhöhten Medikamentenaufnahme sowie einer erhöhten Alkylierung und Hemmung der Reparatur von letalen und subletalen Schäden, die durch das Medikament induziert wurden, liegt (ISSELS 2008). Es wurden jedoch keine Gewebeproben bei den einzelnen Therapiesitzungen zur Evaluierung des Zusammenhanges der intratumoralen DOX-Konzentration und der verabreichten DOX-Dosierung in Therapiegruppe I entnommen. Es zeigte sich in vorangegangenen Studien, dass aufgrund der Heterogenität der Tumoren eine kleine Menge Tumorgewebe nicht repräsentativ ist. Auch eine heterogene Verteilung des DOX im Tumorgewebe muss angenommen werden (ZIMMERMANN 2014, TROEDSON 2015). In der Therapiegruppe II wurden deshalb die Tumoren nach einer einmaligen Therapiesitzung mit der Applikation von freiem DOX (# VI, VII, VIII) oder DPPG₂-TSL-DOX (# IX, X, XI) mit einer simultanen RHT chirurgisch entfernt, um die DOX-Konzentration im Tumorgewebe zu messen. Es ergab sich ein Anreicherungsfaktor von 3,4 (DPPG₂-TSL-DOX/freies DOX), also eine 3,4-fach höher gemessene DOX-Konzentration im Tumorgewebe bei der Anwendung von

thermosensitivem liposomalen DOX im Vergleich zu freiem DOX. Eine Limitation hierbei ist jedoch, dass Tumoren sehr heterogen sind und nekrotische Areale aufweisen können. Bei der Bestimmung wurde der gesamte Tumor bearbeitet, auch mit den nekrotischen Arealen, die je nach Tumor unterschiedlich ausgeprägt sind und in denen keine Freisetzung des DOX stattfindet. Es handelt sich hierbei um einen Mittelwert des DOX aus dem gesamten Tumorgewebe. Der tatsächliche Wert könnte viel höher liegen, wenn die nekrotischen Bereiche nicht in die Messung mit einbezogen werden würden. Außerdem war es nicht möglich, die Tumoren zu exakt demselben Zeitpunkt unmittelbar nach der Hyperthermie zu entnehmen. Die Zeiten variierten zwischen 81 Minuten und 124 Minuten. In einem Rattenmodell lag der Anreicherungsfaktor von DPPG₂-TSL bei einer fokussierten Erwärmung von Weichteilsarkomen 15-fach höher. In dieser Studie wurde ebenfalls die gesamte DOX-Konzentration im Tumor gemessen, auch mit den nekrotischen und zystischen Anteilen, weshalb die DOX-Konzentration in den vitalen Anteilen sogar höher sein könnte. Dieser Effekt wurde bei der visuellen Inspektion bei der Zerlegung der Tumoren als gering eingestuft, aber eine Histologie lag nicht vor (WILLERDING et al. 2016). Das Muskelgewebe von gesunden Schweinen wurde mit milder Hyperthermie in zwei Bereichen therapiert. Die Hyperthermie wurde 10 Minuten und 60 Minuten nach Beginn der Infusion mit DPPG₂-TSL-DOX gestartet und es wurde eine 15-fache und 7-fache Erhöhung der DOX-Konzentration in den Muskelvolumina im Vergleich zu dem unbehandelten Gewebe dokumentiert (SEBEKE et al. 2022). In der vorliegenden Studie wurde ein Anreicherungsfaktor von 3,4 ermittelt, was für die Heterogenität des FISS spricht.

Tumoransprechen der Therapiegruppe I

Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass ein Ansprechen auf eine Therapie mit freiem DOX bei lediglich 50 % vorübergehend zu beobachten ist. In dieser Studie zeigten drei Patienten eine progressive Erkrankung (# I 187,18 %, # II 55,61 %, # III 67,43 %). Bei dem Patienten # I wurde ein Austritt von seröser bis gallertiger Flüssigkeit bei der Implantation der Temperaturmesssonde beobachtet, die für eine Nekrose sprechen könnte. Nekrotische Areale können infolge der Therapie oder einer Tumorprogression entstehen. Die Patienten # II, # III und # IV zeigten ebenfalls einen Flüssigkeitsaustritt bei der Implantation der Temperaturmesssonde. Bei dem Patienten # II handelte es sich um ein Rezidiv. Rezidive zeigen charakteristisch ein aggressiveres Wachstum als Primärtumoren.

Bei dem Patienten # III mit einem Primärtumor wurden bei der abschließenden Bildgebung (PET-MRT) noduläre Veränderungen in der Lunge detektiert, die nicht beprobt wurden, aber Radiopharmakon anreicherten. Dies sprach für eine Lungenmetastasierung, weshalb von einer weiteren Therapie in Form einer Tumorresektion mit einer anschließenden Strahlentherapie abgeraten wurde. Bei einem Patienten (# IV) lag eine stabile Erkrankung mit einer Volumenreduktion von 26,81 % vor. Aufgrund eines Gewichtsverlustes von 24 %, bedingt durch die Therapie, musste die Behandlung vor der letzten Therapiesitzung abgebrochen werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei einem Fortführen der Therapie eine weitere Volumenreduktion stattgefunden hätte, um eine partielle Remission zu erreichen.

Bei dem Patienten # V war ein Volumenrückgang des Tumors um 51,82 % zu beobachten, was für eine partielle Remission sprechen würde, jedoch entwickelte dieser Patient einen tastbaren Ausläufer innerhalb des Therapiefeldes nach der dritten Therapiesitzung sowie eine zweite Umfangsvermehrung in der Nähe des Tumors, im Randbereich des Therapiefeldes. Wie bereits beschrieben, gibt es intra- und intertumorale Heterogenitäten in der Wärmeleistung und Perfusion, wodurch davon ausgegangen werden muss, dass bei der Verwendung einer zentralen intratumoralen Temperaturmesssonde die entlang des Sonden-Kanals erhobenen Daten nicht repräsentativ für den gesamten Tumor sind (LANDON et al. 2011). Dies gilt vor allem für die Peripherie. Eine Satellitenmetastase oder ein neuer Primärtumor kann vorgelegen haben. Die neue Umfangsvermehrung wurde nicht beprobt. Es kann aufgrund der beweglichen Haut von Katzen nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass es bei der Legung der intratumoralen Temperaturmesssonde zu einer Implantation von Tumorzellen gekommen ist. Bei diesem Patienten wurde außerdem in der letzten PET-MRT- Untersuchung eine weitere Radiopharmakon-anreichernde Umfangsvermehrung in der Kniefalte, im Bereich des Nahtendes der vorangegangenen Fibrosarkom-Entfernung, detektiert. Es handelt sich bei diesem Patienten bereits um ein Rezidiv. Dieser Befund sprach auch für eine Satellitenmetastase oder einen neuen Primärtumor. Die Umfangsvermehrung wurde bei der chirurgischen Resektion ebenfalls entfernt und pathohistologisch untersucht. Es handelte sich um ein Fibrosarkom. Im Rahmen des Follow-up wurde bei dem Patienten eine noduläre Verschattung in der Lunge festgestellt, bei der eine Lungenmetastase nicht ausgeschlossen werden konnte.

Vergleichend mit der Studie von Troedson, bei der unter Verwendung von DPPG₂-TSL- DOX in einer Dosierung von 1,0 mg/kg in Kombination mit einer simultanen RHT in den manuellen Handmessungen eine partielle Remission bei allen Patienten in dieser Dosierungsgruppe dokumentiert wurde, zeigte sich in der vorliegenden Studie mit drei Progressionen (# I, II, III), einer stabilen Erkrankung (# IV) und einer partiellen Remission (# V) des mit freiem DOX und einer simultanen RHT therapierten Tumors, ein schlechteres Tumoransprechen. Aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen durch das freie DOX in der aktuellen Studie musste bei einem Patienten (# IV) die Therapie abgebrochen werden. In der vorangegangenen Studie wurden die systemischen Nebenwirkungen als geringer im Vergleich zu einer Standardtherapie mit DOX eingestuft (TROEDSON 2015).

Limitationen

Eine Beurteilung des therapeutischen Effektes ist in dieser Studie kritisch anzusehen, da die Ermittlung der Tumervolumina mittels manueller Handmessungen erfolgte, die von Therapiezyklus zu Therapiezyklus miteinander verglichen wurden. Um Messungenauigkeiten bei den Handmessungen zu minimieren, da bei verschiedenen Personen unterschiedliche Messergebnisse erlangt werden, wurden diese, insofern es möglich war, von der gleichen Person durchgeführt. Die Beurteilung einer Volumenveränderung vor allem in der Tiefe kann auch zu größeren Ungenauigkeiten führen, wenn keine genaue Abgrenzung zu dem umgebenden Gewebe vorliegt. Bei einer Bildgebung in Form einer CT- und MRT-Untersuchung insbesondere einer PET-MRT-Untersuchung können zusätzliche Daten wie Diffusion und Perfusion des Tumors erfasst und das metabolische Ansprechen beurteilt werden. Bei einer Zunahme der nekrotischen Areale, die in einer Bildgebung detektiert werden können, kann sich die Größe des Tumors ändern, was zu einer Fehlinterpretation bei der manuellen Handmessung führen kann. Zudem ist dies ein aussagekräftiger Parameter zur Beurteilung des Tumoransprechens (BAUR et al. 2003).

Neben der Behandlung von Primärtumoren wurden auch Rezidive in die Studie eingeschlossen, die ein aggressiveres Verhalten als Primärtumoren zeigen, was sich auch hier widerspiegelt. Bei einem Rezidiv (# II) war eine Progression zu verzeichnen und bei dem anderen Rezidiv (# V) entwickelten sich unter der Therapie weitere Umfangsvermehrungen.

Aufgrund der geringen Anzahl der Patienten für beide Therapiegruppen konnte keine statistische Analyse durchgeführt werden. In der Therapiegruppe II wurden drei Patienten mit freiem DOX und simultaner RHT sowie drei Patienten mit DPPG₂-TSL-DOX und simultaner RHT therapiert, um die DOX-Konzentration im Tumorgewebe zu messen. Willerding et al. untersuchten in einer ähnlichen Studie verschiedene Hyperthermie-Methoden auf die Wirksamkeit der Medikamentenabgabe unter Verwendung von DPPG₂-TSL als Wirkstoffträger mit eingekapselten DOX bei Ratten mit experimentellen Tumoren und verwendeten drei Tiere für jede Untergruppe (WILLERDING et al. 2016).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Studie wurde die Pharmakokinetik, der therapeutische Effekt und die Toxizität sowie Durchführbarkeit einer neoadjuvanten Therapie mit freiem DOX und einer simultanen RHT bei inoperablen feline Fibrosarkomen evaluiert und die Ergebnisse mit vorangegangenen Studien, die eine neoadjuvante Therapie mit DPPG₂-TSL-DOX in Kombination mit einer simultanen RHT bei Fibrosarkomen der Katze durchführten, verglichen (ZIMMERMANN 2014, TROEDSON 2015). Zudem wurde in der vorliegenden Studie erstmals beim Fibrosarkom der Katze die Anreicherung von DOX im Tumor bei der Anwendung von DPPG₂-TSL-DOX im Vergleich zu freiem DOX gemessen.

In der aktuellen Studie zeigte sich, wie auch schon in den vorangegangenen Studien von Zimmermann und Troedson, eine gute Durchführbarkeit der neoadjuvanten Therapie bei feline Fibrosarkomen (ZIMMERMANN 2014, TROEDSON 2015). Vergleichend wurden in der aktuellen Studie nur Tumoren eingeschlossen, deren Größe eine vollständige Ankopplung des Applikators des Hyperthermie-Gerätes ermöglichen. Zu große Tumervolumina, die der Applikator nicht vollständig umfassen kann, können zu einer inhomogenen Erwärmung führen, was eine Limitation in beiden vorangegangenen Studien darstellte (ZIMMERMANN 2014, TROEDSON 2015).

Bei vier Patienten (# I, II, IV, V) der Therapiegruppe I wurden die Tumoren chirurgisch entfernt und die Patienten erhielten im Anschluss eine Strahlentherapie mit einem kurativen Ansatz in drei von vier Fällen (# I, II, IV). Aufgrund des PET-MRT-Befundes bei dem Patienten # III, der für eine Metastasierung in die Lunge sprach, wurde von einer Operation und Strahlentherapie abgesehen. Die Nebenwirkungen der Therapie waren mild bis schwerwiegend. Bei einem Patienten (# IV) musste die Therapie aufgrund gastrointestinaler Nebenwirkungen des freien DOX, die mit einem Gewichtsverlust Grad III einhergingen, vorzeitig abgebrochen werden. Bei diesem Patienten war auch eine Thrombozytopenie Grad II zu beobachten, die ebenfalls eine Nebenwirkung des freien DOX dargestellt haben könnte. Drei von fünf Patienten (# I, II, III) zeigten eine progressive Erkrankung unter Therapie, bei einem Patienten (# IV) war eine stabile Erkrankung zu beobachten und ein Patient (# V) zeigte eine partielle Remission des therapierten

Tumors, jedoch entwickelte dieser Patient einen tastbaren Ausläufer sowie eine zweite Umfangsvermehrung, die nicht beprobt wurde, am Rande des Therapiefeldes. Zudem entwickelte der Patient nachweislich ein weiteres Sarkom außerhalb des Therapiefeldes. Bei diesem Patienten handelte es sich bereits um ein Rezidiv, das im Rahmen der Studie therapiert wurde. Troedson zeigte vergleichend zuvor bei der Therapie von Katzen mit DPPG₂-TSL-DOX in einer Dosierung von 1,0 mg/kg eine Tumorremission bei allen Patienten bei vertretbaren Nebenwirkungen (TROEDSON 2015).

In der Therapiegruppe II wurden alle Patienten chirurgisch und strahlentherapeutisch behandelt, da nur eine Therapiesitzung durchgeführt wurde und deshalb nur operable Tumoren in diese Gruppe eingeschlossen wurden. Fünf Patienten (# VI, VII, IX, X, XI) erhielten eine Strahlentherapie mit einem kurativen Ansatz und ein Patient (# VIII) eine palliative Strahlentherapie, da es sich um ein Rezidiv handelte und die Behandlung des Primärtumors bereits mit einer definitiven Strahlentherapie erfolgte.

Auch in der Pharmakokinetik zeigen sich Unterschiede in der Therapie mit DPPG₂-TSL-DOX und einer simultanen RHT im Vergleich zu der RHT simultan mit einer Applikation von freiem DOX (TROEDSON 2015). Die DOX-Halbwertszeit ist bei einer Anwendung von DPPG₂-TSL-DOX ohne eine Hyperthermie im Vergleich zu freiem DOX höher und die AUC ist bei freiem DOX geringer (TROEDSON 2015, HOSSANN et al. 2021). In Therapiegruppe II wurde zudem eine 3,4-fach höhere Konzentration von DOX bei der Anwendung von DPPG₂-TSL-DOX im Vergleich zu freiem DOX im Tumor gemessen. Mit diesem Ergebnis würde sich auch erklären lassen, warum DPPG₂-TSL-DOX bei einer gleichen Dosierung therapeutisch effektiver ist als freies DOX, da mehr bioverfügbares DOX im Tumor angereichert wird. Unter Berücksichtigung der Heterogenität dieser Tumoren könnte die Anreicherung des DOX in den Regionen mit einer Gefäßversorgung tatsächlich noch viel höher liegen und somit wäre auch eine noch höhere Anreicherung von DOX bei der Verwendung von DPPG₂-TSL-DOX im Vergleich zu freiem DOX möglich. Die Konzentration des DOX wurde in der vorliegenden Studie im gesamten Tumor gemessen, ohne die nekrotischen Anteile des Tumors zu berücksichtigen, in denen eine Anreicherung des DOX aufgrund der fehlenden vaskulären Versorgung nicht gewährleistet ist. Es wurde ein Mittelwert des DOX im gesamten Tumor bestimmt. Eine Evaluierung der DOX-Konzentration von

DPPG₂-TSL-DOX unter Herausnahme der nekrotischen Anteile wäre sinnvoll, um aussagekräftigere Daten zu erheben. Für eine statistische Analyse bedarf es höherer Patientenzahlen, was bei weiteren Studien berücksichtigt werden sollte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die neoadjuvante Therapie mit DPPG₂-TSL-DOX und einer simultanen RHT als Bestandteil einer multimodalen Therapie bei inoperablen Fibrosarkomen der Katze eine Überlegenheit gegenüber der Therapie mit freiem DOX und einer simultanen RHT zeigt.

VII. SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate the pharmacokinetics, therapeutic effect, toxicity and feasibility of neoadjuvant therapy with free DOX and simultaneous regional hyperthermia for inoperable feline fibrosarcoma and to compare the results with previous studies that performed neoadjuvant therapy with DPPG₂-TSL-DOX in combination with simultaneous regional hyperthermia for fibrosarcoma in cats (ZIMMERMANN 2014, TROEDSON 2015). In addition, the present study measured the accumulation of DOX in the tumor when using DPPG₂-TSL-DOX compared to free DOX in cat fibrosarcoma for the first time.

Like the previous studies by Zimmermann and Troedson, this study showed a good feasibility of neoadjuvant therapy for feline fibrosarcoma (ZIMMERMANN 2014, TROEDSON 2015). For the purposes of comparison, only tumors were included here that were large enough to allow complete coupling of the applicator of the hyperthermia device. Tumors that are too large for the applicator to fully encompass can lead to inhomogeneous heating, which was a limitation in both previous studies (ZIMMERMANN 2014, TROEDSON 2015).

In four patients (#I, II, IV, V) of treatment group I, the tumors were surgically removed and the patients then received radiation therapy in a curative intent in three out of four cases (# I, II, IV). Based on the patient's (# III) PET-MRI findings, which indicated a metastasis in the lung, surgery and radiotherapy was not recommended. The side effects of treatment were mild to severe. In one patient (# IV), treatment had to be discontinued due to gastrointestinal side effects of free DOX, which were associated with a weight loss grade III. This patient also had grade II thrombocytopenia, which could also have represented a side effect of free DOX. Three out of five patients (# I, II, III) showed a tumor progression under treatment, one patient (# IV) a stable disease and one patient (# V) a partial remission of the treated tumor. However, this patient (# V) developed a palpable extension and a second enlargement at the edge of the treatment field. In addition, the patient developed another sarcoma outside the treatment area. This patient was already suffering from a relapse, which was treated as part of this study. Troedson showed previously in the treatment of cats with DPPG₂-TSL-DOX at a dosage of 1.0 mg/kg, a tumor remission in all patients with acceptable side effects

(TROEDSON 2015).

In treatment group II, all patients were treated with surgery and radiation therapy, because only one treatment session was carried out and therefore only operable tumors were included in this group. Five patients (# VI, VII, IX, X, XI) received radiation therapy with a curative intent and one patient (# VIII) a palliative radiation therapy, because it was a recurrence and the primary tumor had already been treated with radiation therapy with a curative intent.

Pharmacokinetic differences were also observed between treatment with DPPG₂-TSL-DOX and simultaneous regional hyperthermia compared to regional hyperthermia with simultaneous application of free DOX (TROEDSON 2015). DOX half-life is higher when DPPG₂-TSL-DOX is used without hyperthermia in comparison to free DOX and the AUC is lower when using free DOX (TROEDSON 2015, HOSSANN et al. 2021). In treatment group II, a 3.4-fold higher concentration of DOX was also measured in the tumor when DPPG₂-TSL-DOX was used compared to free DOX. This result would also explain why DPPG₂-TSL-DOX is therapeutically more effective than free DOX in the same dosage, because more bioavailable DOX is accumulated in the tumor. Considering the heterogeneity of these tumors, the accumulation of DOX in areas with vascularization could in fact be much higher and thus a higher accumulation of DOX would also be possible when using DPPG₂-TSL-DOX in comparison to free DOX. In the present study, the concentration was measured in the whole tumor without considering the necrotic areas in the tumors in which accumulation is not guaranteed due to the lack of vascularization. The mean value of DOX in the entire tumor was determined. An evaluation of the DOX concentration of DPPG₂-TSL-DOX and free DOX by removing the necrotic portions would be useful to obtain more meaningful data. For a statistical analysis, a higher number of patients is required, which should be considered in further studies.

In summary, it can be said that neoadjuvant treatment with DPPG₂-TSL-DOX and simultaneous regional hyperthermia as part of a multimodal treatment for inoperable fibrosarcoma in cats showed a superiority over the treatment with free DOX and simultaneous regional hyperthermia.

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: <i>Bestimmung der DOX-Konzentration im Tumorgewebe.....</i>	52
Tabelle 2: <i>Studienprotokoll Therapiegruppe I.....</i>	92
Tabelle 3: <i>Studienprotokoll Therapiegruppe II.....</i>	94
Tabelle 4: <i>Tumorcharakteristika und Tumoransprechen der Therapiegruppe I .</i>	95
Tabelle 5: <i>Tumorcharakteristika der Therapiegruppe II</i>	96
Tabelle 6: <i>Weiterführende Therapie der Therapiegruppe I.....</i>	97
Tabelle 7: <i>Weiterführende Therapie der Therapiegruppe II.....</i>	98
Tabelle 8: <i>Systemische Toxizität Therapiegruppe II.....</i>	111

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Lokalisation der intratumoralen Sonde	32
Abbildung 2 (links): Positionierung des Applikators	33
Abbildung 3 (rechts): Eine Therapie mit dem Hyperthermie-Gerät.....	33
Abbildung 4: Ausfall der Sinushaare bei dem Patienten # I	45
Abbildung 5: Veränderung des Tumolvolumens unter Therapie	48
Abbildung 6: Pharmakokinetik des freien DOX <u>ohne</u> Hyperthermie	49
Abbildung 7: Pharmakokinetik des freien DOX <u>mit</u> Hyperthermie.....	50
Abbildung 8: Pharmakokinetik von freiem DOX bei allen Patienten <u>ohne</u> RHT	50
Abbildung 9: Pharmakokinetik von freiem DOX bei allen Patienten <u>mit</u> RHT...	51
Abbildung 10: DOX-Konzentration im Tumorgewebe	51
Abbildung 11: Charge [26/24D]	99
Abbildung 12: Charge 30-29D	100
Abbildung 13: Hyperthermie-Daten Therapiegruppe I.....	101
Abbildung 14: Hyperthermie-Daten Therapiegruppe II	102
Abbildung 15: Hämoglobin	103
Abbildung 16: Hämatokrit.....	104
Abbildung 17: Gesamtleukozyten	105
Abbildung 18: Neutrophile Granulozyten	106
Abbildung 19: Thrombozyten	107
Abbildung 20: Kreatinin.....	108
Abbildung 21: Harnstoff.....	109
Abbildung 22: Körpergewicht	110

X. LITERATURVERZEICHNIS

Abu Lila AS, Kiwada H, Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage. *J Control Release* 2013; 172(1):38–47. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.07.026.

Allen TM. *Pharmacokinetics and Biopharmaceutics of Lipid-Based Drug Formulations*: 2007: 49-64. 2007.

Anyarambhatla GR, Needham D. Enhancement of the Phase Transition Permeability of DPPC Liposomes by Incorporation of MPPC: A New Temperature-Sensitive Liposome for use with Mild Hyperthermia: *Journal of liposome research* 1999; 9(4): 491-506. doi: 10.3109/08982109909035549.

Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965; 13(1):238–52. doi: 10.1016/s0022-2836(65)80093-6.

Baur A, Stäbler A, Wendtner CM, Arbogast S, Rahman SA, Santl M, Issels R, Reiser M. MR-imaging changes of musculoskeletal soft-tissue sarcomas associated with neoadjuvant chemotherapy and hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2003; 19(4): 391-401. doi: 10.1080/0265673021000058366.

Ben-Yosef R, Kapp DS. Persistent and/or late complications of combined radiation therapy and hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 1992; 8(6): 733-45. doi: 10.3109/02656739209005021.

Borys N, Dewhirst MW. Drug development of lyso-thermosensitive liposomal doxorubicin: Combining hyperthermia and thermosensitive drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2021; 178:113985. doi: 10.1016/j.addr.2021.113985.

Bruggmoser G, Bauchowitz S, Canters R, Crezee H, Ehmann M, Gellermann J, Lamprecht U, Lomax N, Messmer MB, Ott O, Abdel-Rahman S, Schmidt M, Sauer R, Thomsen A, Wessalowski R, van Rhooen G. Guideline for the clinical application, documentation and analysis of clinical studies for regional deep hyperthermia: quality management in regional deep hyperthermia. *Strahlenther Onkol* 2012; 188 Suppl 2:198–211. doi: 10.1007/s00066-012-0176-2.

Carminato A, Vascellari M, Marchioro W, Melchiotti E, Mutinelli F. Microchip-associated fibrosarcoma in a cat. *Vet Dermatol* 2011; 22(6):565–9. doi: 10.1111/j.1365-3164.2011.00975.x.

Cohen M, Wright JC, Brawner WR, Smith AN, Henderson R, Behrend EN. Use of surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine-associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219(11):1582–9. doi: 10.2460/javma.2001.219.1582.

Coyne MJ, Reeves NC, Rosen DK. Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210(2):249–51.

Cronin K, Page RL, Spodnick G, Dodge R, Hardie EN, Price GS, Ruslander D, Thrall DE. Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 1998; 39(1):51–6. doi: 10.1111/j.1740-8261.1998.tb00325.x.

Daly MK, Saba CF, Crochik SS, Howerth EW, Kosarek CE, Cornell KK, Roberts RE, Northrup NC. Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat. *J Feline Med Surg* 2008; 10(2):202–5. doi: 10.1016/j.jfms.2007.10.011.

Davidson EB, Gregory CR, Kass PH. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg* 1997; 26: 265-9. doi: 10.1111/j.1532-950x.1997.tb01497.x.

Dewey WC. Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic. *Int J Hyperthermia* 2009; 25(1):3–20. doi: 10.1080/02656730902747919.

Dewhirst MW, Sim DA. The utility of thermal dose as a predictor of tumor and normal tissue responses to combined radiation and hyperthermia. *Cancer Res* 1984; 44(10 Suppl):4772s-4780s.

Dewhirst MW, Vujaskovic Z, Jones E, Thrall D. Re-setting the biologic rationale for thermal therapy. *Int J Hyperthermia* 2005; 21(8):779–90. doi: 10.1080/02656730500271668.

Dou Y, Hynynen K, Allen C. To heat or not to heat: Challenges with clinical translation of thermosensitive liposomes. *J Control Release* 2017; 249:63–73. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.01.025.

Eckstein C, Guscetti F, Roos M, de las Mulas MJ, Kaser-Hotz B, Rohrer Bley C. A retrospective analysis of radiation therapy for the treatment of feline vaccine-associated sarcoma. *Vet Comp Oncol* 2009; 7(1): 54-68. doi: 10.1111/j.1476-5829.2008.00173.x.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; 45(2):228–47. doi: 10.1016/j.ejca.2008.10.026.

Estapé Senti M, Jongh CA de, Dijkxhoorn K, Verhoef JJF, Szebeni J, Storm G, Hack CE, Schiffelers RM, Fens MH, Boross P. Anti-PEG antibodies compromise the integrity of PEGylated lipid-based nanoparticles via complement. *J Control Release* 2022; 341:475–86. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.11.042.

Falk MH, Issels RD. Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia* 2001; 17(1):1–18. doi: 10.1080/02656730150201552.

Fülöp T, Kozma GT, Vashegyi I, Mészáros T, Rosivall L, Urbanics R, Storm G, Metselaar JM, Szebeni J. Liposome-induced hypersensitivity reactions: Risk reduction by design of safe infusion protocols in pigs. *J Control Release* 2019; 309:333–8. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.07.005.

Galettis P, Boutagy J, Ma DD. Daunorubicin pharmacokinetics and the correlation with P-glycoprotein and response in patients with acute leukaemia. *Br J Cancer* 1994; 70: 324-9.

Garay RP, El-Gewely R, Armstrong JK, Garratty G, Richette P. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opin Drug Deliv* 2012; 9(11):1319–23. doi: 10.1517/17425247.2012.720969.

Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, Multhoff G. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 2005; 65(12):5238–47. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3804.

Gillette SM, Dewhirst MW, Gillette EL, Thrall DE, Page RL, Powers BE, Withrow SJ, Rosner G, Wong C, Sim DA. Response of canine soft tissue sarcomas to radiation or radiation plus hyperthermia: a randomized phase II study. *Int J Hyperthermia* 1992; 8(3):309–20. doi: 10.3109/02656739209021786.

Giudice C, Stefanello D, Sala M, Cantatore M, Russo F, Romussi S, Travetti O, Di Giancamillo M, Grieco V. Feline injection-site sarcoma: recurrence, tumour grading and surgical margin status evaluated using the three-dimensional histological technique. *Vet J* 2010; 186(1):84–8. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.07.019.

Gobar GM, Kass PH. World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220(10):1477–82. doi: 10.2460/javma.2002.220.1477.

Gordon KB, Tajuddin A, Guitart J, Kuzel TM, Eramo LR, VonRoenn J. Hand-foot syndrome associated with liposome-encapsulated doxorubicin therapy. *Cancer* 1995; 75(8):2169–73. doi: 10.1002/1097-0142(19950415)75:8<2169::aid-cncr2820750822>3.0.co;2-h.

Gulati M, Bajad S, Singh S, Ferdous AJ, Singh M. Development of liposomal amphotericin B formulation. *J Microencapsul* 1998; 15(2):137–51. doi: 10.3109/02652049809006844.

Hahn KA, Endicott MM, King GK, Harris-King FD. Evaluation of radiotherapy alone or in combination with doxorubicin chemotherapy for the treatment of cats with incompletely excised soft tissue sarcomas: 71 cases (1989-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231(5):742–5. doi: 10.2460/javma.231.5.742.

Harrington KJ, Mohammadtaghi S, Uster PS, Glass D, Peters AM, Vile RG, Stewart JSW. Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. *Clin Cancer Res* 2001; 7(2):243–54.

Hauck ML, LaRue SM, Petros WP, Poulson JM, Yu D, Spasojevic I, Pruitt AF, Klein A, Case B, Thrall DE, Needham D, Dewhirst MW. Phase I trial of doxorubicin-containing low temperature sensitive liposomes in spontaneous canine tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12(13):4004–10. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0226.

Haveman J, Smals OAG, Rodermond HM. Effects of hyperthermia on the rat bladder: a pre-clinical study on thermometry and functional damage after treatment. *Int J Hyperthermia* 2003; 19(1):45–57. doi: 10.1080/02656730210158455.

Hendrick MJ, Goldschmidt MH. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199(8):968.

Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, Wang Y-Y, Somlyo AP. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Res* 1992; 52(19):5391–4.

Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, Haviland JC, Schelling SH, Engler SJ, Gliatto JM. Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). *J Am Vet Med Assoc* 1994; 205(10):1425–9.

Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, Shofer FS, Vail DM. Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216(1):58–61. doi: 10.2460/javma.2000.216.58.

Hossann M, Hirschberger J, Schmidt R, Baumgartner C, Zimmermann K, Baer S, Ratzlaff C, Peller M, Troedson K, Limmer S, Brühshwein A, Dörfelt R, Kreutzmann N, Wess G, Knösel T, Schagon O, Fischer J, Grüll H, Willerding L, Schmidt M, Meyer-Lindenberg A, Issels RD, Schwaiger M, Eggermont AM, ten Hagen TL, Lindner LH. A Heat-Activated Drug-Delivery Platform Based on Phosphatidyl-(oligo)-glycerol Nanocarrier for Effective Cancer Treatment. *Adv NanoBiomed Res* 2021, 2000089. doi: 10.1002/anbr.202000089.

Hossann M, Syunyaeva Z, Schmidt R, Zengerle A, Eibl H, Issels RD, Lindner LH. Proteins and cholesterol lipid vesicles are mediators of drug release from thermosensitive liposomes. *J Control Release* 2012; 162(2):400–6. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.06.032.

Hossann M, Wang T, Wiggenhorn M, Schmidt R, Zengerle A, Winter G, Eibl H, Peller M, Reiser M, Issels RD, Lindner LH. Size of thermosensitive liposomes influences content release. *J Control Release* 2010; 147: 436-43. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.013.

Hossann M, Wiggenhorn M, Schwerdt A, Wachholz K, Teichert N, Eibl H, Issels RD, Lindner LH. In vitro stability and content release properties of phosphatidylglyceroglycerol containing thermosensitive liposomes. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768(10):2491–9. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.05.021.

Ishida O, Maruyama K, Sasaki K, Iwatsuru M. Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice. *Int J Pharm* 1999; 190(1):49–56. doi: 10.1016/s0378-5173(99)00256-2.

Ishida T, Maeda R, Ichihara M, Irimura K, Kiwada H. Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections. *J Control Release* 2003a; 88(1):35–42. doi: 10.1016/S0168-3659(02)00462-5.

Ishida T, Masuda K, Ichikawa T, Ichihara M, Irimura K, Kiwada H. Accelerated clearance of a second injection of PEGylated liposomes in mice. *Int J Pharm* 2003b; 255(1-2):167–74. doi: 10.1016/S0378-5173(03)00085-1.

Issels RD. Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer* 2008; 44(17):2546–54. doi: 10.1016/j.ejca.2008.07.038.

Issels RD, Abdel-Rahman S, Wendtner C-M, Falk MH, Kurze V, Sauer H, Aydemir U, Hiddemann W. Neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia (RHT) for locally advanced primary or recurrent high-risk adult soft-tissue sarcomas (STS) of adults: long-term results of a phase II study. *Eur J Cancer* 2001; 37(13):1599–608. doi: 10.1016/s0959-8049(01)00183-6.

Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wessalowski R, Reichardt P, Wust P, Ghadjjar P, Hohenberger P, Angele M, Salat C, Vujaskovic Z, Daugaard S, Mella O, Mansmann U, Dürr HR, Knösel T, Abdel-Rahman S, Schmidt M, Hiddemann W, Jauch K-W, Belka C, Gronchi A, European Organisation for the Research and Treatment of Cancer-Soft Tissue and Bone Sarcoma Group, European Society for Hyperthermic Oncology. Effect of Neoadjuvant Chemotherapy Plus Regional Hyperthermia on Long-term Outcomes Among Patients With Localized High-Risk Soft Tissue Sarcoma: The EORTC 62961-ESHO 95 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2018; 4(4):483–92. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.4996.

Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem B-C, Abdel-Rahman S, Daugaard S, Salat C, Wendtner C-M, Vujaskovic Z, Wessalowski R, Jauch K-W, Dürr HR, Ploner F, Baur-Melnyk A, Mansmann U, Hiddemann W, Blay J-Y, Hohenberger P, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group, European Society for Hyperthermic Oncology. Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol* 2010; 11(6):561–70. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70071-1.

Issels RD, Mittermüller J, Gerl A, Simon W, Ortmaier A, Denzlinger C, Sauer H, Wilmanns W. Improvement of local control by regional hyperthermia combined with systemic chemotherapy (ifosfamide plus etoposide) in advanced sarcomas: updated report on 65 patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; 117 Suppl 4:S141-7. doi: 10.1007/BF01613220.

Judson I, Radford JA, Harris M, Blay J-Y, van Hoesel Q, Le Cesne A, van Oosterom AT, Clemons MJ, Kamby C, Hermans C, Whittaker J, Donato di Paola E, Verweij J, Nielsen S. Randomised phase II trial of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL/CAELYX) versus doxorubicin in the treatment of advanced or metastatic soft tissue sarcoma: a study by the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2001; 37(7):870–7. doi: 10.1016/s0959-8049(01)00050-8.

Kass PH, Barnes WG, Spangler WL, Chomel BB, Culbertson MR. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203(3):396–405.

Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, McGill LD, Esplin DG, Lester S, Slater M, Meyer EK, Boucher F, Peters EM, Gobar GG, Htoo T, Decile K. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223(9):1283–92. doi: 10.2460/javma.2003.223.1283.

Kent MS. Cats and Chemotherapy: Treat as ‘small dogs’ at your peril. *J Feline Med Surg* 2013; 15: 419-24. doi: 10.1177/1098612X13483240.

Kessler M. Vakzine-assoziierte Fibrosarkome bei der Katze https://www.tierklinik-hofheim.de/fileadmin/user_upload/Downloads_Tieraerzte/Merkblaetter_neu/Vakzine-assoziierte_Fibrosarkome_bei_der_Katze.pdf. 2005.

Kleiter M, Tichy A, Willmann M, Pagitz M, Wolfesberger B. Concomitant liposomal doxorubicin and daily palliative radiotherapy in advanced feline soft tissue sarcomas. *Vet Radiol Ultrasound* 2010; 51(3):349–55. doi: 10.1111/j.1740-8261.2009.01661.x.

Kleiter MM, Yu D, Mohammadian LA, Niehaus N, Spasojevic I, Sanders L, Viglianti BL, Yarmolenko PS, Hauck M, Petry NA, Wong TZ, Dewhirst MW, Thrall DE. A Tracer Dose of Technetium-99m–Labeled Liposomes Can Estimate the Effect of Hyperthermia on Intratumoral Doxil Extravasation. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (22):6800-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0839.

Kneidl B, Peller M, Winter G, Lindner LH, Hossann M. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *Int J Nanomedicine* 2014; 9:4387–98. doi: 10.2147/IJN.S49297.

Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, Page RL, Price GS, Williams LE, Hardie EM, Mathews KG, Thrall DE. Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2002; 43(5):473–9. doi: 10.1111/j.1740-8261.2002.tb01036.x.

Kong G, Anyarambhatla G, Petros WP, Braun RD, Colvin OM, Needham D, Dewhirst MW. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release. *Cancer Res* 2000a; 60(24):6950–7.

Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size. *Cancer Res* 2000b; 60(16):4440–5.

Kong G, Dewhirst MW. Hyperthermia and liposomes. *Int J Hyperthermia* 1999; 15(5): 345-70.

Kozma GT, Shimizu T, Ishida T, Szebeni J. Anti-PEG antibodies: Properties, formation, testing and role in adverse immune reactions to PEGylated nanobiopharmaceuticals. *Adv Drug Deliv Rev* 2020; 154-155:163–75. doi: 10.1016/j.addr.2020.07.024.

Ladlow J. Injection site-associated sarcoma in the cat: treatment recommendations and results to date. *J Feline Med Surg* 2013; 15(5):409–18. doi: 10.1177/1098612X13483239.

Laginha KM, Verwoert S, Charrois GJR, Allen TM. Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin Cancer Res* 2005; 11(19 Pt 1):6944–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0343.

Landon CD, Park J-Y, Needham D, Dewhirst MW. Nanoscale Drug Delivery and Hyperthermia: The Materials Design and Preclinical and Clinical Testing of Low Temperature-Sensitive Liposomes Used in Combination with Mild Hyperthermia in the Treatment of Local Cancer. *Open Nanomed J* 2011; 3:38–64. doi: 10.2174/1875933501103010038.

Li L, Hagen TLM ten, Haeri A, Soullié T, Scholten C, Seynhaeve ALB, Eggermont AMM, Koning GA. A novel two-step mild hyperthermia for advanced liposomal chemotherapy. *J Control Release* 2014; 174:202–8. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.11.012.

Li L, Hagen TLM ten, Hossann M, Süß R, van Rhoon GC, Eggermont AMM, Haemmerich D, Koning GA. Mild hyperthermia triggered doxorubicin release from optimized stealth thermosensitive liposomes improves intratumoral drug delivery and efficacy. *J Control Release* 2013; 168(2):142–50. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.03.011.

Limmer S, Hahn J, Schmidt R, Wachholz K, Zengerle A, Lechner K, Eibl H, Issels RD, Hossann M, Lindner LH. Gemcitabine treatment of rat soft tissue sarcoma with phosphatidylglycerol-based thermosensitive liposomes. *Pharm Res* 2014; 31(9):2276–86. doi: 10.1007/s11095-014-1322-6.

Lindner LH, Eichhorn ME, Eibl H, Teichert N, Schmitt-Sody M, Issels RD, Dellian M. Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time. *Clin Cancer Res* 2004; 10(6):2168–78. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0035.

Lindner LH, Hossann M. Factors affecting drug release from liposomes. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2010; 13(1):111–23.

Lindner LH, Issels R. [Thermosensitive liposomes for regional hyperthermia]. *Dtsch Med Wochenschr* 2003; 128: 2020-2.

Lindner LH, Issels RD. Hyperthermia in soft tissue sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* 2011; 12(1):12–20. doi: 10.1007/s11864-011-0144-6.

Lyass O, Uziely B, Ben-Yosef R, Tzemach D, Heshing NI, Lotem M, Brufman G, Gabizon A. Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2000; 89(5):1037–47. doi: 10.1002/1097-0142(20000901)89:5<1037::aid-cncl3>3.0.co;2-z.

Macy DW, Guillermo Couto C. Prevention and treatment of injection-site sarcomas. *J Feline Med Surg* 2001; 3(4):169–70. doi: 10.1053/jfms.2001.0145.

Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 71-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.10.002.

Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 2000; 65(1-2): 271-84. doi: 10.1016/s0168-3659(99)00248-5.

Manzoor AA, Lindner LH, Landon CD, Park J-Y, Simnick AJ, Dreher MR, Das S, Hanna G, Park W, Chilkoti A, Koning GA, ten Hagen TLM, Needham D, Dewhirst MW. Overcoming limitations in nanoparticle drug delivery: triggered, intravascular release to improve drug penetration into tumors. *Cancer Res* 2012; 72(21):5566–75. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1683.

Martano M, Morello E, Buracco P. Feline injection-site sarcoma: past, present and future perspectives. *Vet J* 2011; 188(2):136–41. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.025.

Martano M, Morello E, Ughetto M, Iussich S, Petterino C, Cascio P, Buracco P. Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. *Vet J* 2005; 170: 84-90. doi: 10.1016/j.tvjl.2004.04.004.

Matteucci ML, Anyarambhatla G, Rosner G, Azuma C, Fisher PE, Dewhirst MW, Needham D, Thrall DE. Hyperthermia increases accumulation of technetium-99m-labeled liposomes in feline sarcomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6(9):3748–55.

Mauldin GN, Matus RE, Patnaik AK, Bond BR, Mooney SC. Efficacy and toxicity of doxorubicin and cyclophosphamide used in the treatment of selected malignant tumors in 23 cats. *J Vet Intern Med* 1988; 2(2):60–5. doi: 10.1111/j.1939-1676.1988.tb02794.x.

McEntee MC, Page RL. Feline vaccine-associated sarcomas. *J Vet Intern Med* 2001; 15(3):176–82. doi: 10.1892/0891-6640(2001)015<0176:fvs>2.3.co;2.

Milani V, Noessner E, Ghose S, Kuppner M, Ahrens B, Scharner A, Gastpar R, Issels RD. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int J Hyperthermia* 2002; 18(6):563–75. doi: 10.1080/02656730210166140.

Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(8):583–92. doi: 10.1038/nrc1893.

Müller N, Kessler M. Curative-intent radical en bloc resection using a minimum of a 3 cm margin in feline injection-site sarcomas: a retrospective analysis of 131 cases. *J Feline Med Surg* 2018; 20(6):509–19. doi: 10.1177/1098612X17717882.

Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat Mater* 2013; 12(11):991–1003. doi: 10.1038/nmat3776.

Nakamura Y, Mochida A, Choyke PL, Kobayashi H. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconj Chem* 2016; 27(10):2225–38. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00437.

Needham D, Anyarambhatla G, Kong G, Dewhirst MW. A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res* 2000; 60(5):1197–201.

Noessner E, Gastpar R, Milani V, Brandl A, Hutzler PJS, Kuppner MC, Roos M, Kremmer E, Asea A, Calderwood SK, Issels RD. Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J Immunol* 2002; 169(10):5424–32. doi: 10.4049/jimmunol.169.10.5424.

Ogilvie GK, Reynolds HA, Richardson RC, Withrow SJ, Norris AM, Henderson RA, Klausner JS, Fowler JD, McCaw D. Phase II evaluation of doxorubicin for treatment of various canine neoplasms. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195(11):1580–3.

O'Keefe DA, Sisson DD, Gelberg HB, Schaeffer DJ, Krawiec DR. Systemic toxicity associated with doxorubicin administration in cats. *J Vet Intern Med* 1993; 7(5):309–17. doi: 10.1111/j.1939-1676.1993.tb01024.x.

Oleson JR, Samulski TV, Leopold KA, Clegg ST, Dewhirst MW, Dodge RK, George SL. Sensitivity of hyperthermia trial outcomes to temperature and time: implications for thermal goals of treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25(2):289–97. doi: 10.1016/0360-3016(93)90351-u.

Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MCCH, Arcangeli G, Dahl O, Mella O, Bentzen SM. Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology. 1996. *Int J Hyperthermia* 2009; 25(5):323–34. doi: 10.1080/02656730903091986.

Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthey K, Huang SK, Lee K-D, Woodle MC, Lasic DD, Redemann C, Martin FJ. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(24):11460–4. doi: 10.1073/pnas.88.24.11460.

Peller M, Willerding L, Limmer S, Hossann M, Dietrich O, Ingrisich M, Sroka R, Lindner LH. Surrogate MRI markers for hyperthermia-induced release of doxorubicin from thermosensitive liposomes in tumors. *J Control Release* 2016; 237:138–46. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.035.

Phelps HA, Kuntz CA, Milner RJ, Powers BE, Bacon NJ. Radical excision with five-centimeter margins for treatment of feline injection-site sarcomas: 91 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2011; 239(1):97–106. doi: 10.2460/javma.239.1.97.

Poirier VJ, Thamm DH, Kurzman ID, Jeglum KA, Chun R, Obradovich JE, O'Brien M, Fred RM, 3rd, Phillips BS, Vail DM. Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. *J Vet Intern Med* 2002; 16(6):726–31. doi: 10.1111/j.1939-1676.2002.tb02415.x.

Poste G, Bucana C, Raz A, Bugelski P, Kirsh R, Fidler IJ. Analysis of the fate of systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery. *Cancer Res* 1982; 42(4):1412–22.

Prabhakar U, Maeda H, Jain RK, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, Barry ST, Gabizon A, Grodzinski P, Blakey DC. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res* 2013; 73(8):2412–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4561.

Regenold M, Bannigan P, Evans JC, Waspe A, Temple MJ, Allen C. Turning down the heat: The case for mild hyperthermia and thermosensitive liposomes. *Nanomedicine* 2022; 40:102484. doi: 10.1016/j.nano.2021.102484.

Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 191(3):423–33. doi: 10.1084/jem.191.3.423.

Schlemmer M, Wendtner CM, Issels RD. Ifosfamide with regional hyperthermia in soft-tissue sarcomas. *Oncology* 2003; 65 Suppl 2:76–9. doi: 10.1159/000073365.

Schmidt R. Neuartige thermosensitive Liposomen zur zielgerichteten Therapie solider Tumoren - Charakterisierung in vitro und in vivo -, Diss. med. vet. München 2011.

Sebeke LC, Castillo Gómez JD, Heijman E, Rademann P, Simon AC, Ekdawi S, Vlachakis S, Toker D, Mink BL, Schubert-Quecke C, Yeo SY, Schmidt P, Lucas C, Brodesser S, Hossann M, Lindner LH, Grüll H. Hyperthermia-induced doxorubicin delivery from thermosensitive liposomes via MR-HIFU in a pig model. *J Control Release* 2022; 343:798–812. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.02.003.

Sebeke LC, Rademann P, Maul AC, Yeo SY, Castillo Gómez JD, Deenen DA, Schmidt P, de Jager B, Heemels WPMH, Grüll H, Heijman E. Visualization of thermal washout due to spatiotemporally heterogenous perfusion in the application of a model-based control algorithm for MR-HIFU mediated hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2021; 38(1):1174–87. doi: 10.1080/02656736.2021.1933616.

Séguin B. Injection site sarcomas in cats. *Clin Tech Small Anim Pract* 2002; 17(4):168–73. doi: 10.1053/svms.2002.36605.

Seynhaeve ALB, Dicheva BM, Hoving S, Koning GA, Hagen TLM ten. Intact Doxil is taken up intracellularly and released doxorubicin sequesters in the lysosome: evaluated by in vitro/in vivo live cell imaging. *J Control Release* 2013; 172(1):330–40. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.08.034.

Seynhaeve ALB, Hoving S, Schipper D, Vermeulen CE, Wiel-Ambagtsheer G aan de, van Tiel ST, Eggermont AMM, Hagen TLM ten. Tumor necrosis factor alpha mediates homogeneous distribution of liposomes in murine melanoma that contributes to a better tumor response. *Cancer Res* 2007; 67(19):9455–62. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1599.

Srivastav A, Kass PH, McGill LD, Farver TB, Kent MS. Comparative vaccine-specific and other injectable-specific risks of injection-site sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2012; 241(5): 595-602.

Stangl S, Gehrman M, Riegger J, Kuhs K, Riederer I, Sievert W, Hube K, Mocikat R, Dressel R, Kremmer E, Pockley AG, Friedrich L, Vigh L, Skerra A, Multhoff G. Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(2):733–8. doi: 10.1073/pnas.1016065108.

Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63(12):1020–30. doi: 10.1016/j.addr.2011.06.017.

Thrall DE, LaRue SM, Yu D, Samulski T, Sanders L, Case B, Rosner G, Azuma C, Poulson J, Pruitt AF, Stanley W, Hauck ML, Williams L, Hess P, Dewhirst MW. Thermal dose is related to duration of local control in canine sarcomas treated with thermoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11(14):5206–14. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0091.

Thrall DE, Maccarini P, Stauffer P, MacFall J, Hauck M, Snyder S, Case B, Linder K, Lan L, McCall L, Dewhirst MW. Thermal dose fractionation affects tumour physiological response. *Int J Hyperthermia* 2012; 28(5):431–40. doi: 10.3109/02656736.2012.689087.

Thrall DE, Prescott DM, Samulski TV, Dewhirst MW, Cline JM, Lee J, Page RL, Oleson JR. Serious toxicity associated with annular microwave array induction of whole-body hyperthermia in normal dogs. *Int J Hyperthermia* 1992; 8(1):23–32. doi: 10.3109/02656739209052876.

Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(2):145–60. doi: 10.1038/nrd1632.

Troedson EKE. Dosisfindungsstudie zur Therapie des feline Fibrosarkoms mit Doxorubicin-beladenen thermosensitiven Phosphatidylglycerin-Liposomen mit simultaner regionaler Hyperthermie - Toxizität und Effektivität [Dissertation med. vet.]. München: LMU; 2015.

van der Zee J, González González D, van Rhoon GC, van Dijk JDP, van Putten WLJ, Hart AAM. Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. Dutch Deep Hyperthermia Group. *Lancet* 2000; 355(9210):1119–25. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02059-6.

van Valenberg FJP, Brummelhuis ISG, Lindner LH, Kuhnle F, Wedmann B, Schweizer P, Hossann M, Witjes JA, Oosterwijk E. DPPG2-Based Thermosensitive Liposomes with Encapsulated Doxorubicin Combined with Hyperthermia Lead to Higher Doxorubicin Concentrations in the Bladder Compared to Conventional Application in Pigs: A Rationale for the Treatment of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Int J Nanomedicine* 2021; 16:75–88. doi: 10.2147/IJN.S280034.

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989; 49(23): 6449-65.

Wang J-C, Liu X-Y, Lu W-L, Chang A, Zhang Q, Goh B-C, Lee H-S. Pharmacokinetics of intravenously administered stealth liposomal doxorubicin modulated with verapamil in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 62(1):44–51. doi: 10.1016/j.ejpb.2005.06.004.

Wendtner C-M, Abdel-Rahman S, Krych M, Baumert J, Lindner LH, Baur A, Hiddemann W, Issels RD. Response to neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia predicts long-term survival for adult patients with retroperitoneal and visceral high-risk soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 2002; 20(14):3156–64. doi: 10.1200/JCO.2002.07.146.

Willerding L, Limmer S, Hossann M, Zengerle A, Wachholz K, Hagen TLM ten, Koning GA, Sroka R, Lindner LH, Peller M. Method of hyperthermia and tumor size influence effectiveness of doxorubicin release from thermosensitive liposomes in experimental tumors. *J Control Release* 2016; 222:47–55. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.12.004.

Williams LE, Banerji N, Klausner JS, Kapur V, Kanjilal S. Establishment of two vaccine-associated feline sarcoma cell lines and determination of in vitro chemosensitivity to doxorubicin and mitoxantrone. *Am J Vet Res* 2001; 62(9):1354–7. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.1354.

Wust P, Hegewisch-Becker S, Issels R. Hyperthermie - aktueller Stand und therapeutische Ergebnisse. *Dtsch Med Wochenschr* 2003; 128(39):2023–9. doi: 10.1055/s-2003-42557.

Yarmolenko PS, Moon EJ, Landon C, Manzoor A, Hochman DW, Viglianti BL, Dewhirst MW. Thresholds for thermal damage to normal tissues: an update. *Int J Hyperthermia* 2011; 27(4):320–43. doi: 10.3109/02656736.2010.534527.

Yatvin MB, Weinstein JN, Dennis WH, Blumenthal R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science* 1978; 202(4374):1290–3. doi: 10.1126/science.364652.

Zagar TM, Vujaskovic Z, Formenti S, Rugo H, Muggia F, O'Connor B, Myerson R, Stauffer P, Hsu I-C, Diederich C, Straube W, Boss M-K, Boico A, Craciunescu O, Maccarini P, Needham D, Borys N, Blackwell KL, Dewhirst MW. Two phase I dose-escalation/pharmacokinetics studies of low temperature liposomal doxorubicin (LTLTD) and mild local hyperthermia in heavily pretreated patients with local regionally recurrent breast cancer. *Int J Hyperthermia* 2014; 30(5):285–94. doi: 10.3109/02656736.2014.936049.

Zhu Y, Wang F, Zhao Y, Zheng X. Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia: a literature review of pharmaceutical and clinical aspects. *Eur J Hosp Pharm* 2020; 28(3):124–8. doi: 10.1136/ejhpharm-2020-002311.

Zimmermann K. Doxorubicin-beladene thermosensitive Phosphatidylglycerin-Liposomen mit simultaner regionaler Hyperthermie als Therapieoption des inoperablen feline Fibrosarkoms, [Dissertation med. vet.]. München: LMU; 2014.

Zimmermann K, Hossann M, Hirschberger J, Troedson K, Peller M, Schneider M, Brühshwein A, Meyer-Lindenberg A, Wess G, Wergin M, Dörfelt R, Knösel T, Schwaiger M, Baumgartner C, Brandl J, Schwamberger S, Lindner LH. A pilot trial of doxorubicin containing phosphatidylglycerol based thermosensitive liposomes in spontaneous feline soft tissue sarcoma. *Int J Hyperthermia* 2017; 33(2):178–90. doi: 10.1080/02656736.2016.1230233.

XI. ANHANG

1. Studienprotokoll

1.1. Tabelle 2: Studienprotokoll Therapiegruppe I

	Eingangs- US	Tag 0 Zyklus A	Tag 7	Tag 14 Zyklus B	Tag 21	Tag 28 Zyklus C	Tag 35	Tag 42 Zyklus D	Tag 49	Tag 56 Zyklus E	Tag 63	Tag 70 Zyklus F	Tag 77	Tag 84 Zyklus G	Tag 91 Abschluss- US
Klinische Allgemeinuntersuchung	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tumorausmessung (Caliper)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PET-MRT*	X				X										X
Labor (Blutbild mit Differenzierung, Serumprofil mit Elektrolyten)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Herzultraschall	X														X

*: Patient # I erhielt ausschließlich MRT- anstatt PET-MRT-Untersuchungen.

[illegible]

1.2. Tabelle 3: Studienprotokoll Therapiegruppe II

	Eingangs-US	Einmalige Therapie Tag 0	Abschluss-US Tag 7
Klinische Allgemeinuntersuchung	X	X	X
Tumorausmessung (Caliper)	X	X	
CT	X		
Labor (Blutbild mit Differenzierung, Serumprofil mit Elektrolyten)	X	X	X
Tumor-Staging (Thorax- Röntgen, Abdomen- Ultraschall)	X		
RHT (60 min)		X	
Applikation freies DOX/ DPPG ₂ -TSL-DOX*		X	
Blutentnahme für Pharmakokinetik		X	

*: Patient # VI, # VII und # VIII erhielten freies DOX und Patient # IX, # X und # XI DPPG₂-TSL-DOX.

2. Tumorcharakteristika und Tumoransprechen der Therapiegruppe I

Tabelle 4: Tumorcharakteristika und Tumoransprechen der Therapiegruppe I

Patient #	Tumorlokalisation	Tumorstatus	Tumorvolumen vor Therapie (cm ³)	Tumorvolumen Median vor Therapie (cm ³)	Tumorvolumen Durchschnitt vor Therapie (cm ³)	Tumorvolumen nach Therapie (cm ³)	Änderung des Tumorvolumens (%)	Behandlungseffekt
I	Linke Thoraxwand	Primärtumor	8,11	13,48	16,65	23,29	+187,18	Progressive Erkrankung
II	Linke Bauchwand	1. Rezidiv	13,81			21,49	+55,61	Progressive Erkrankung
III	Auf der Brustwirbelsäule	Primärtumor	13,48			22,57	+67,43	Progressive Erkrankung
IV	Interskapulär	Primärtumor	40,17			29,4	-26,81	Stabile Erkrankung
V	Rechte Bauchwand	1. Rezidiv	7,7			3,71	-51,82	Partielle Remission*

*: Patient # V entwickelte nach der letzten Therapiesitzung eine zweite Umfangsvermehrung in der rechten Kniefalte außerhalb des Therapiefeldes, die ebenfalls chirurgisch entfernt und strahlentherapeutisch behandelt wurde.

3. Tumorcharakteristika der Therapiegruppe II

Tabelle 5: *Tumorcharakteristika der Therapiegruppe II*

Patient #	Tumorlokalisation	Tumorstatus	Tumorzvolumen vor Therapie (cm ³)	Tumorzvolumen Median (cm ³)	Tumorzvolumen Durchschnitt (cm ³)
VI	Linke dorsale Bauchwand	Primärtumor	11,67	9,30	8,95
VII	Brustwirbelsäule im Bereich 4. bis 6. Brustwirbel	Primärtumor	10,92		
VIII	Rechte Thoraxwand	1. Rezidiv	7,67		
IX	Linke dorsale Bauchwand	Primärtumor	5,81		
X	Rechte dorsale Bauchwand	Primärtumor	6,27		
XI	Linke rippengestützte Bauchwand	Primärtumor	11,36		

4. Weiterführende Therapie

4.1. Tabelle 6: Weiterführende Therapie der Therapiegruppe I

Patient #	Chirurgische Exzision	Definitive Strahlentherapie	Palliative Strahlentherapie
I	X	X	–
II	X	X	–
III*	–	–	–
IV	X	X	–
V	X	–	X

*: Patient # III entwickelte unter Therapie Metastasen in der Lunge, weshalb keine chirurgische Exzision und anschließende Strahlentherapie erfolgten.

4.2. Tabelle 7: Weiterführende Therapie der Therapiegruppe II

Patient #	Chirurgische Exzision	Definitive Strahlentherapie	Palliative Strahlentherapie
VI	X	X	–
VII	X	X	–
VIII	X	–	X
IX	X	X	–
X	X	X	–
XI	X	X	–

5. DPPG₂-TSL-DOX-Chargen

5.1. Abbildung 11: Charge [26/24D]

AG Liposomen
Medizinische Klinik III

Analysenzertifikat

N:\Barbara\Chargenzertifikate\2015_06_29 Chargenzertifikat TSL-DOX 26-24D.xlsx\Chargenzertifikat TSL

Stand: 29. Juni 2015

Chargennummer	[26/24D]
Formulierung	DPPC/DSPC/DPPG ₂ 50/20/30 (mol/mol)
Einschluss	Aktive Beladung mit Doxorubicin (ohne Säulenchromatographie)
M _{Mittel} (g/mol)	770,78
Extrusion (nm)	200
Lagerung (°C)	-20

Methode	Parameter	Einheit	Spezifikation	Ergebnis	Bewertung
Phosphatbestimmung	Phospholipidgehalt	mM	≥ 8	45,1	+
Fluoreszenzspektroskopie: Doxorubicinbestimmung	Doxorubicingehalt	mM	≥ 1,2	5	+
		mg/ml	≥ 1	2,90	
	Wirkstoff/Lipid	mol/mol	0,09 - 0,17	0,11	+
Dünnschichtchromatographie	DPPG ₂	%	21,8 - 38,2	29,6	+
	Lyso-PC	%	≤ 3,1	0,8	+
	Lyso-PG ₂	%	≤ 0,5	n.b.	
Dynamische Lichtstreuung	z-Average	nm	122 - 186	131	+
	Aggregate (Intensitätsprofil)		keine	keine	+
	PDI		≤ 0,17	0,114	+
	ζ-Potential	mV	-21,3 bis -29,3	-27,3	+
Differential Scanning Calorimetry	T _m	°C	41,5 - 43	n.b.	
Fluoreszenzspektroskopie	DOX-Freisetzung 1h, 37°C, FCS	%	≤ 12,7	-1,1	+
	DOX-Freisetzung 1h, 42°C, FCS	%	≥ 79,1	95,1	+

5.2. Abbildung 12: Charge 30-29D

AG Liposomen
Medizinische Klinik III

Analysenzertifikat

N:\Barbara\Chargenzertifikate\2016_06_07 Chargenzertifikat TSL-DOX 30-29D für Katzenstudie.xlsx\Chargenzertifikat TSL

Stand: 7. Juni 2016

Chargennummer	30-29D
Formulierung	DPPC/DSPC/DPPG2 50/20/30 (mol/mol)
Einschluss	Aktive Beladung mit Doxorubicin (ohne Säulenchromatographie)
M_{Mittel} (g/mol)	770,78
Extrusion (nm)	200
Lagerung (°C)	-20

Methode	Parameter	Einheit	Spezifikation	Ergebnis	Bewertung
Phosphatbestimmung	Phospholipidgehalt	mM	≥ 8	50,2	+
Fluoreszenzspektroskopie: Doxorubicinbestimmung	Doxorubicingehalt	mM	≥ 1,2	5,21	+
		mg/ml	≥ 1	3,02	
	Wirkstoff/Lipid	mol/mol	0,09 - 0,17	0,10	+
Dünnschichtchromatographie	DPPG2	%	21,8 - 38,2	32,7	+
	Lyso-PC	%	≤ 3,1	0	+
	Lyso-PG2	%	≤ 0,5	n.b.	
Dynamische Lichtstreuung	z-Average	nm	122 - 186	158	+
	Aggregate (Intensitätsprofil)		keine	keine	+
	PDI		≤ 0,17	0,123	+
	ζ-Potential	mV	-21,3 bis -29,3	-26,3	+
Differential Scanning Calorimetry	T _m	°C	41,5 - 43	n.b.	
Fluoreszenzspektroskopie	DOX-Freisetzung 1h, 37°C, FCS	%	≤ 12,7	11,5	+
	DOX-Freisetzung 1h, 42°C, FCS	%	≥ 79,1	94,3	+

6. Daten zur Hyperthermie

6.1. Abbildung 13: Hyperthermie-Daten Therapiegruppe I

<u>Zusammenfassung</u>		Zyklus B	Zyklus C	Zyklus D	Zyklus E	Zyklus F	Zyklus G	Mittel
		CEM43°C	CEM43°C	CEM43°C	CEM43°C	CEM43°C	CEM43°C	
	Anzahl der Zyklen	5	5	5	5	5	4	/Stabw
<u>Therapiewerte</u>								
Mean	Total CEM43°C(Summe, ohne Aufheizphase)	12,7	16,5	13,7	13,9	13,7	11,3	79,5
Median		12,9	14,1	14,0	13,7	13,6	13,8	81,8
Stdabw		0,4	5,0	1,0	0,6	0,7	4,8	4,8
Mean	Mittel	41,8	41,9	41,8	41,9	41,9	41,7	41,8
Stdabw		0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,5	0,1
Mean	T90	41,6	41,6	41,4	41,8	41,8	41,6	41,6
Stdabw		0,3	0,5	0,7	0,1	0,0	0,5	0,4
Mean	T50 (MEDIAN)	41,9	41,9	41,9	41,9	41,9	41,7	41,9
Stdabw		0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,5	0,0
Mean	Tmax	42,6	43,4	42,8	42,5	42,6	42,2	43,7
Stdabw		0,3	1,6	0,4	0,3	0,1	0,5	1,5
Mean	Tmin	40,7	40,4	40,7	41,0	40,8	40,9	39,5
Stdabw		1,2	1,4	0,9	0,7	0,6	0,7	1,0
Mean	Anzahl Messpunkte	60,0	60,0	60,0	60,0	60,0	48,0	
Stdabw		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	24,0	
<u>Aufheizphase</u>								
Mean	Dauer Aufheizen	8,4	5,8	6,3	5,8	5,3	4,7	
Median		8,0	5,0	5,5	6,0	5,5	5,0	
Stdabw		2,7	1,3	1,6	1,1	0,8	0,5	

6.2. Abbildung 14: Hyperthermie-Daten Therapiegruppe II

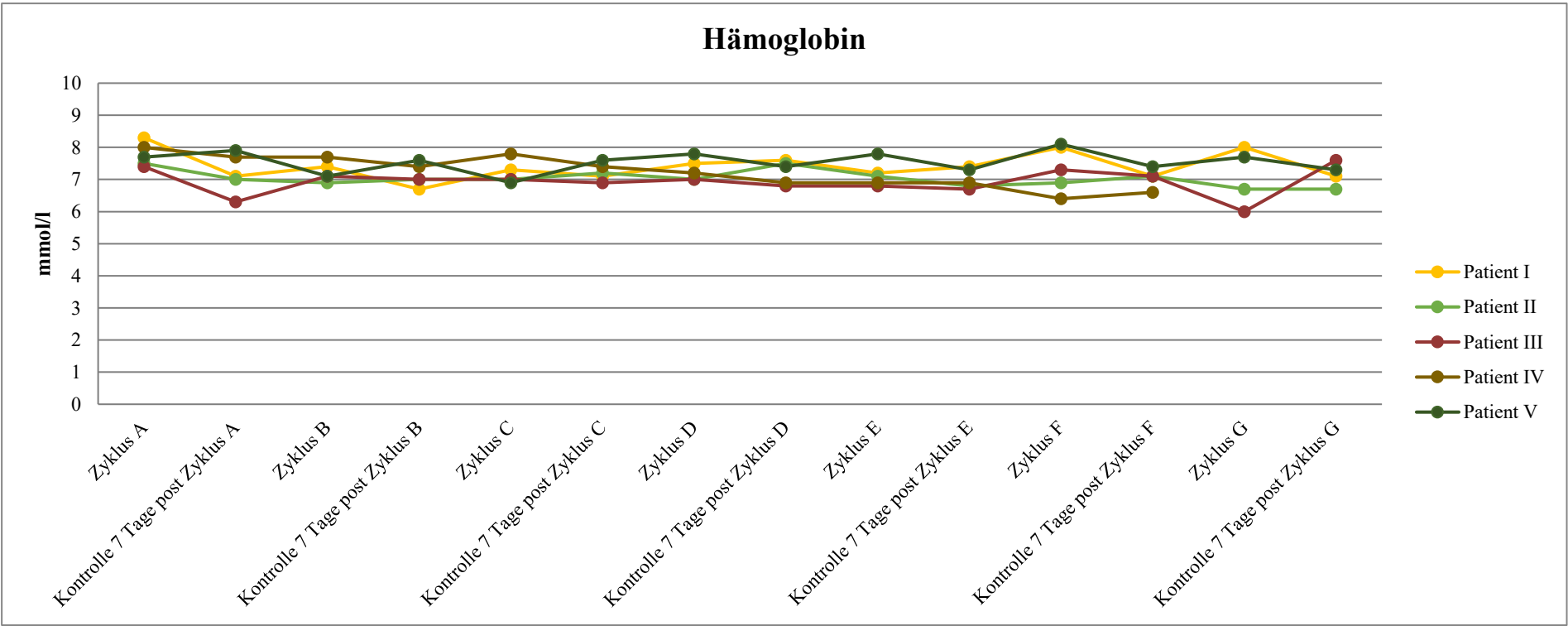
	Thermal Dose	Temperature					Number of Temperature Measurments					
Patient	Total CEM43°C	Mean T [°C]	T90 [°C]	T50 (MEDIAN) [°C]	Tmax [°C]	Tmin [°C]	Total Number	≥ 39°C	≥ 40°C	≥ 41°C	≥ 42°C	≥ 43°C
VI	13,82	41,9	41,8	42,0	42,6	40,7	60	60	60	56	36	0
VII	14,55	41,9	41,9	41,9	43,5	40,9	60	60	60	58	26	1
IX	13,78	41,9	41,9	41,9	42,2	41,4	60	60	60	60	25	0
VIII	13,81	41,9	41,9	41,9	42,2	41	60	60	60	60	26	0
X	12,36	41,8	41,7	41,9	42,4	41,2	60	60	60	60	7	0
XI	13,69	41,9	41,4	41,9	42,8	40,5	60	60	60	56	29	0
Mean	13,7	41,9	41,8	41,9	42,6	41,0	60	60	60	58,3	24,8	
Median	13,8	41,9	41,8	41,9	42,5	41,0	60	60	60	59,0	26,0	
SD	0,7	0,0	0,2	0,0	0,4	0,3	0	0	0	1,8	8,8	

7. Systemische Toxizität

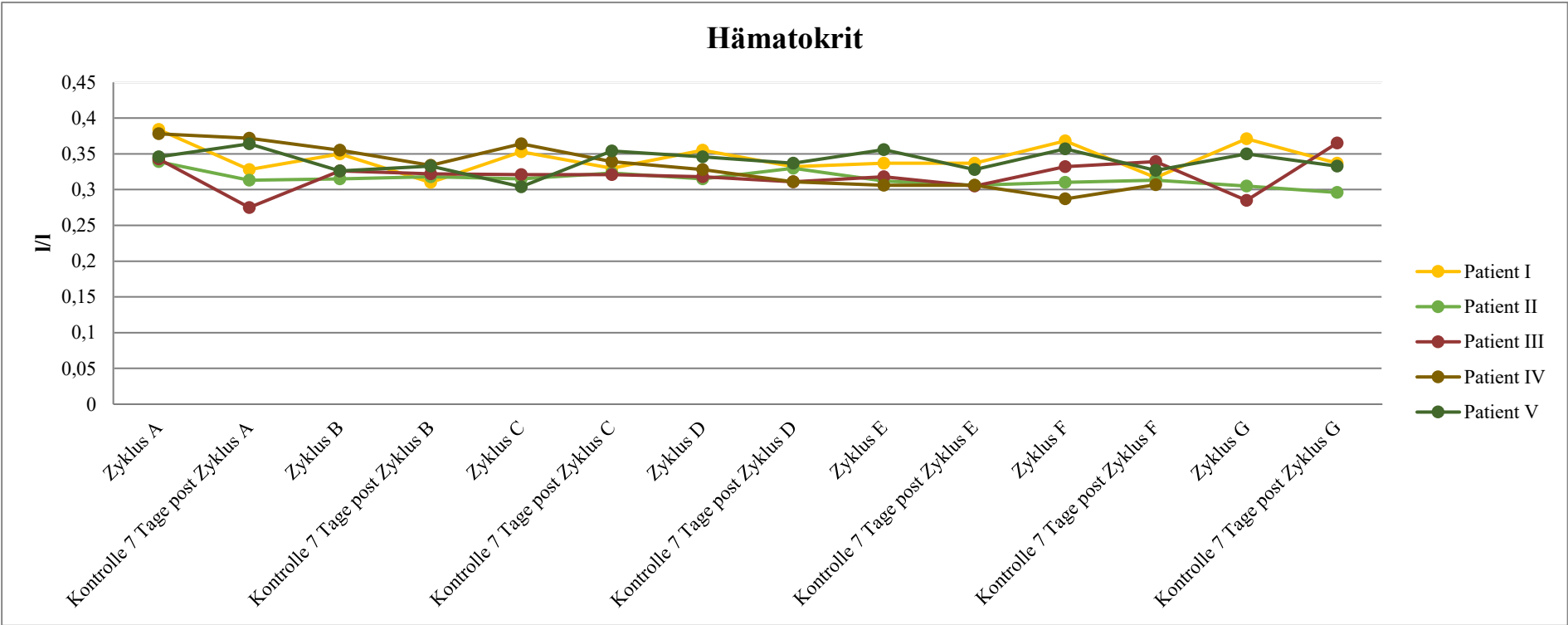
7.1. Therapiegruppe I

7.1.1. Erythrozyten

7.1.1.1. Abbildung 15: Hämoglobin

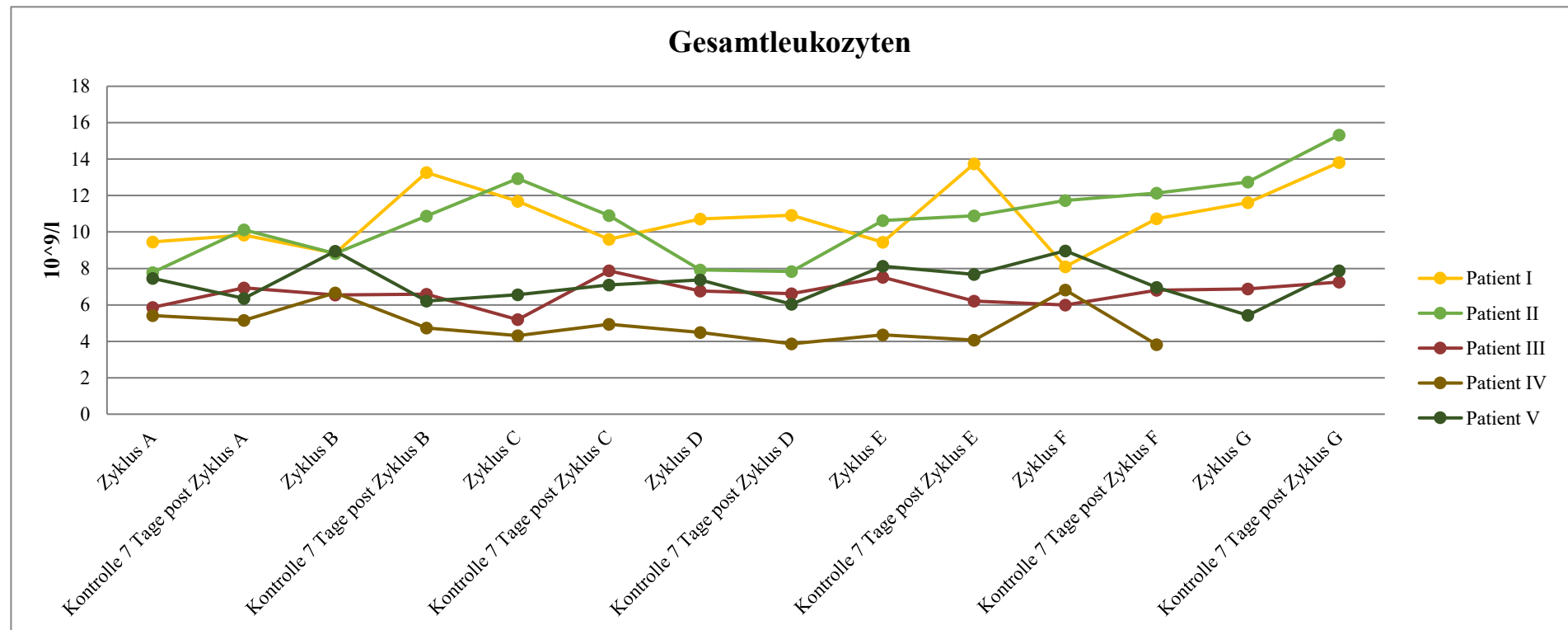


7.1.1.2. *Abbildung 16: Hämatokrit*

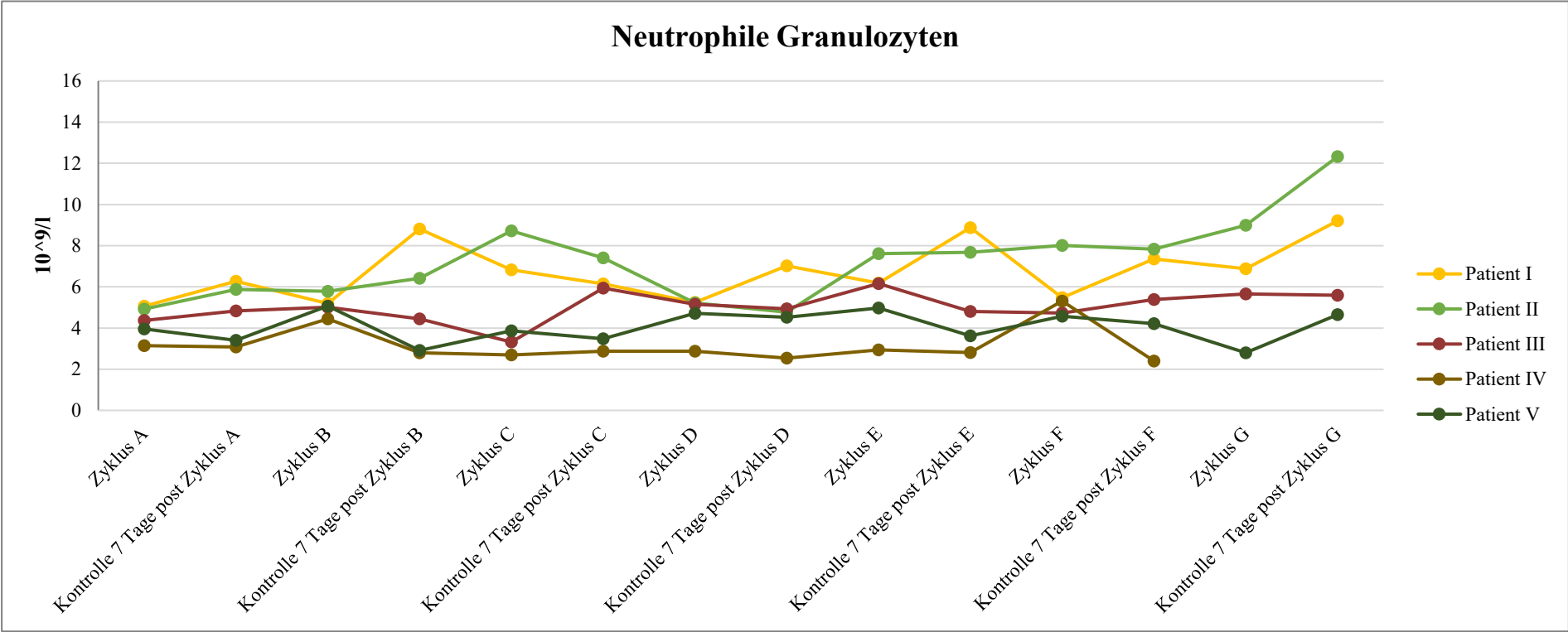


7.1.2. Leukozyten

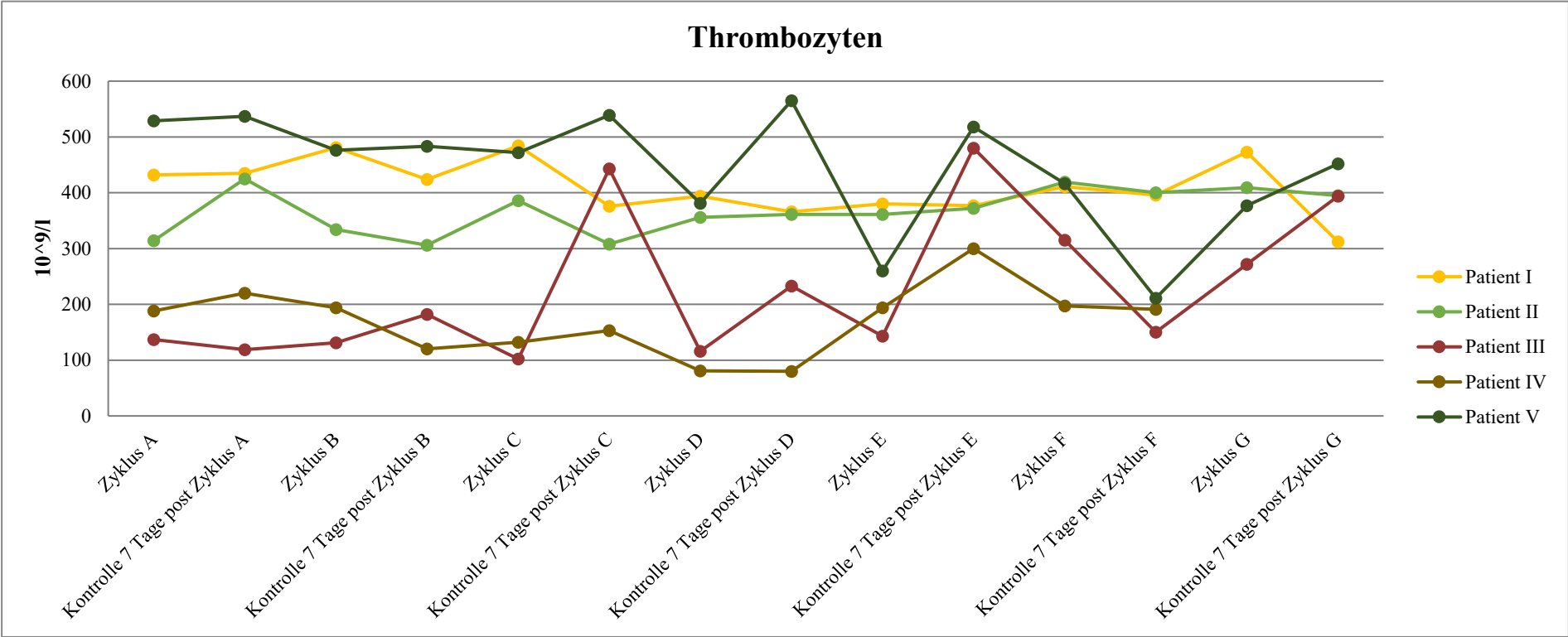
7.1.2.1. Abbildung 17: Gesamtleukozyten



7.1.2.2. **Abbildung 18:** *Neutrophile Granulozyten*

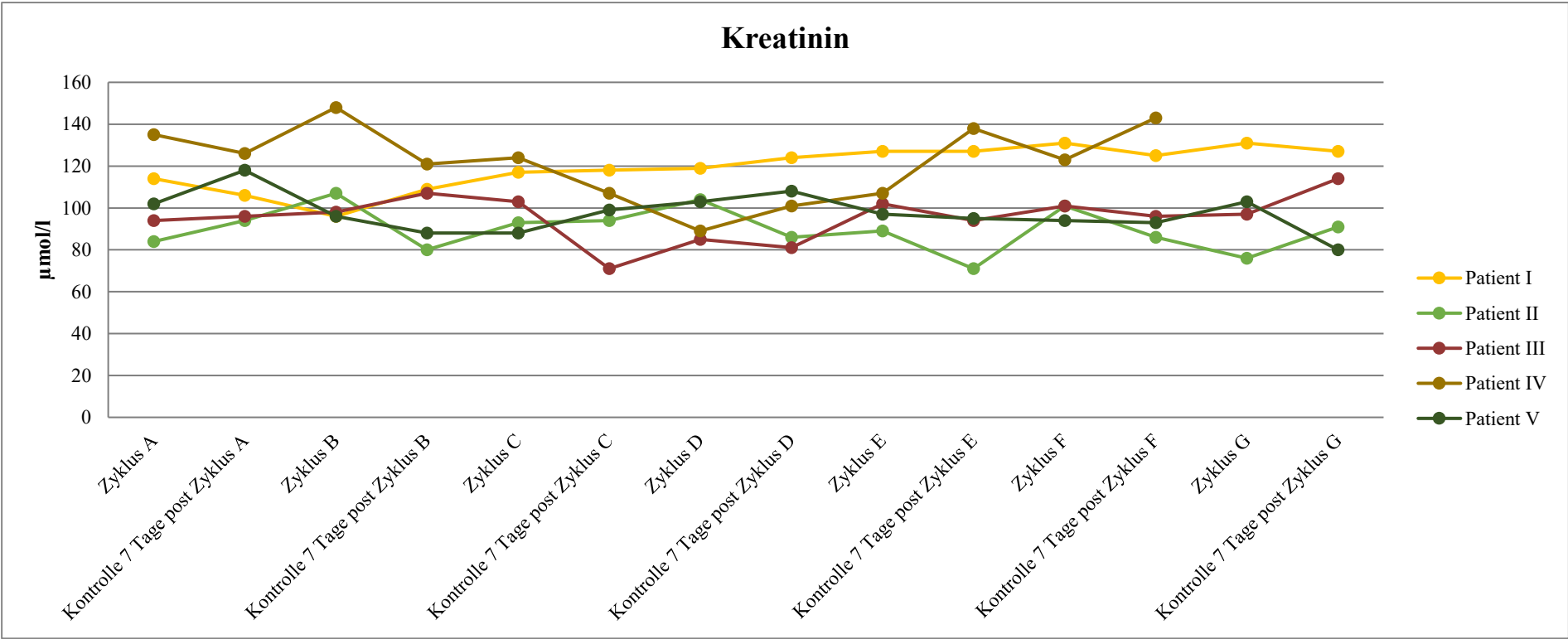


7.1.2.3. Abbildung 19: *Thrombozyten*

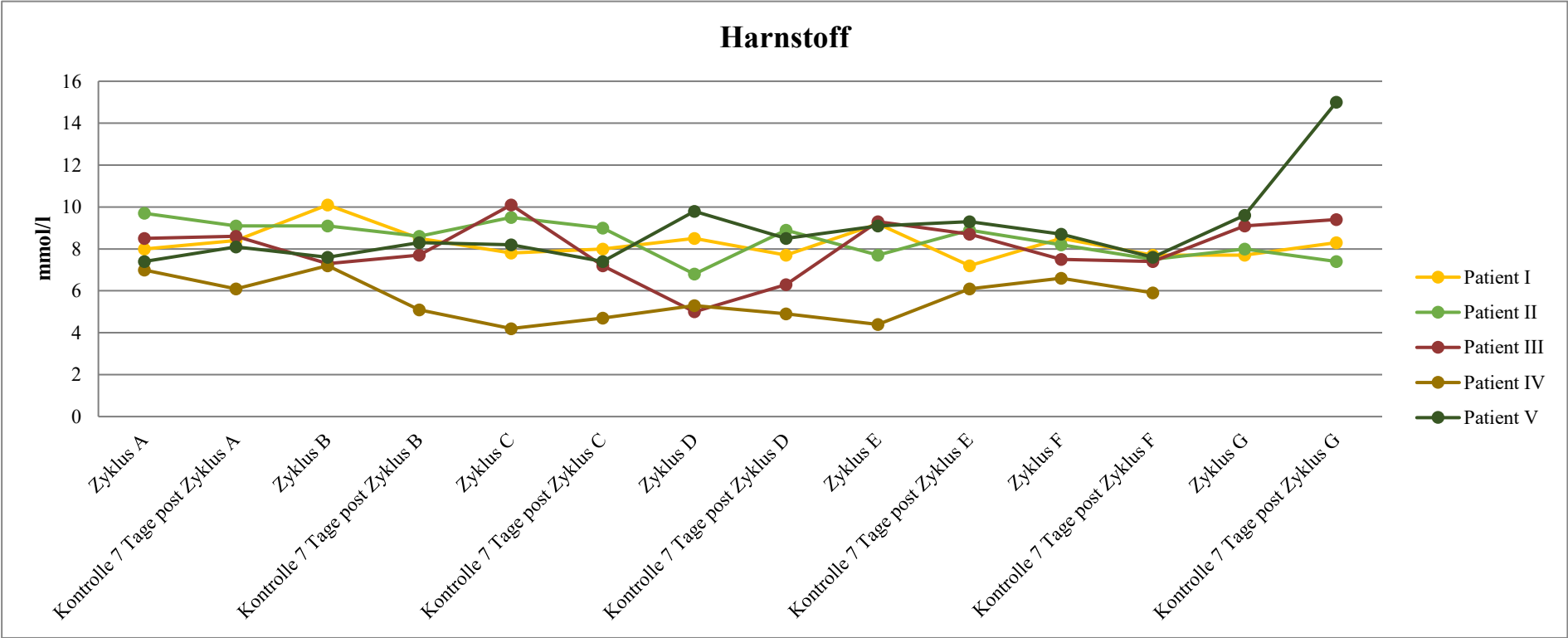


7.1.3. Nierenwerte

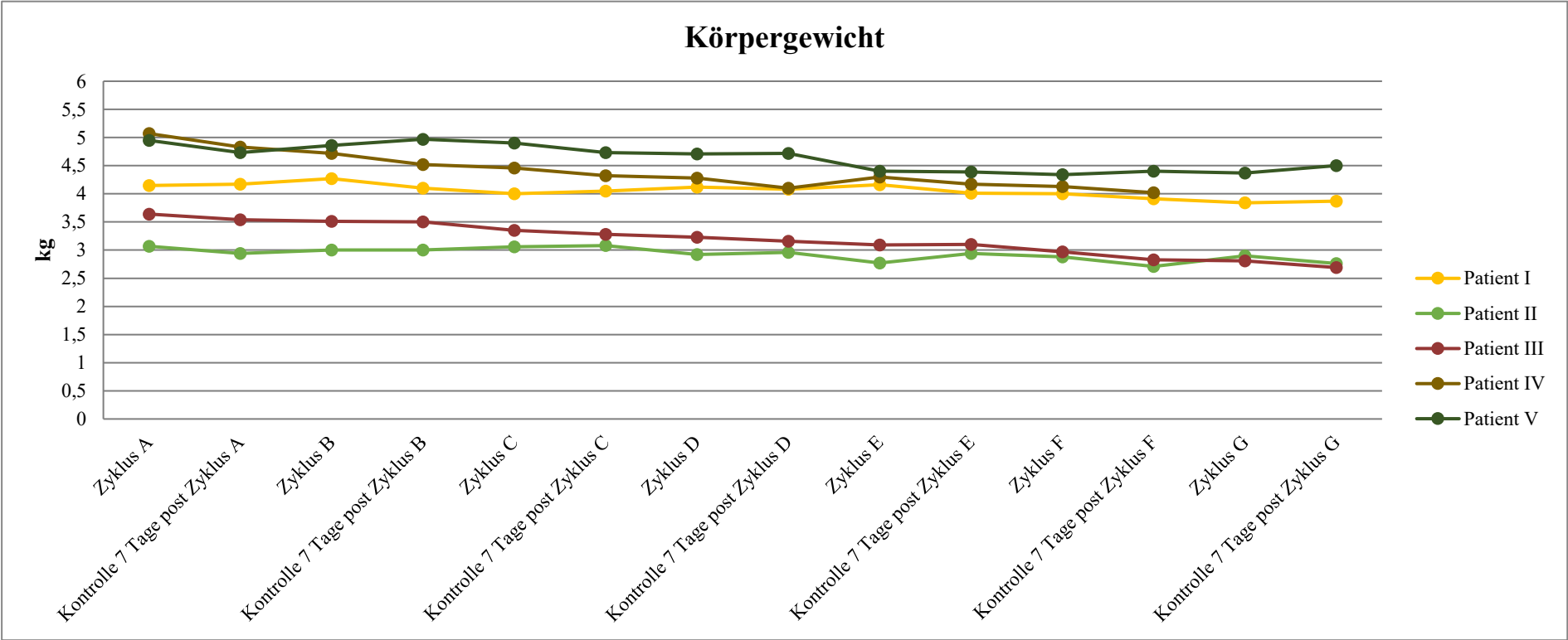
7.1.3.1. Abbildung 20: Kreatinin



7.1.3.2. Abbildung 21: *Harnstoff*



7.1.4. Abbildung 22: Körpergewicht



7.2. **Tabelle 8:** *Systemische Toxizität Therapiegruppe II*

Patient #	Hämoglobin (mmol/l)		Hämatokrit (l/l)		Gesamtleukozyten (10 ⁹ /l)		Neutrophile Granulozyten (10 ⁹ /l)	
	Vor der Therapie	Kontrolle 7 Tage nach Therapie	Vor der Therapie	Kontrolle 7 Tage nach Therapie	Vor der Therapie	Kontrolle 7 Tage nach Therapie	Vor der Therapie	Kontrolle 7 Tage nach Therapie
VI	6,9	5,0	0,321	0,229	5,58	9,20	4,01	7,21
VII	8,2	6,8	0,378	0,306	13,31	8,83	8,03	5,90
VIII	8,6	9,3	0,426	0,446	6,32	8,95	4,04	6,1
IX	8,4	108 g/l*	0,384	0,33*	9,74	5,1*	5,62	3,468*
X	8,4	7,0	0,371	0,307	6,52	5,60	5,16	4,42
XI	8,2	6,3	0,361	0,280	8,20	11,05	5,02	7,69

*: Die Kontrolluntersuchung sieben Tage nach der Behandlung wurde beim Haustierarzt durchgeführt.

**: Es wurden Thrombozyten-Aggregate festgestellt. Dies kann möglicherweise zum Vorliegen einer falsch niedrigen Thrombozytenzahl führen.

Patient #	Thrombozyten (10 ⁹ /l)		Kreatinin (µmol/l)		Harnstoff (mmol/l)		Körpergewicht (kg)	
	Vor der Therapie	Kontrolle 7 Tage nach Therapie	Vor der Therapie	Kontrolle 7 Tage nach Therapie	Vor der Therapie	Kontrolle 7 Tage nach Therapie	Vor der Therapie	Kontrolle 7 Tage nach Therapie
VI	253	491	102	111	8,0	5,5	5,51	4,75
VII	204	404	90	84	9,5	6,9	3,84	3,81
VIII	247	394	115	121	9,2	8,4	5,45	5,21
IX	247	134*, **	131	136,1*	7,6	8,82*	3,93	Daten liegen nicht vor*
X	442	468	110	134	6,0	5,7	8,63	8,22
XI	405	581	123	124	8,9	8,7	2,35	2,18

*: Die Kontrolluntersuchung sieben Tage nach der Behandlung wurde beim Haustierarzt durchgeführt.

**: Es wurden Thrombozyten-Aggregate festgestellt. Dies kann möglicherweise zum Vorliegen einer falsch niedrigen Thrombozytenzahl führen.

XII. DANKSAGUNG

Einen großen Dank möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Hirschberger aussprechen. Er hat mir dieses überaus interessante Thema anvertraut und mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützt sowie ermöglicht, dass ich diese Arbeit abschließen kann.

Ein besonderer Dank gebührt auch PD Dr. Lars Lindner als Projektinitiator für seine Unterstützung und vielen Hilfestellungen bei Fragen und der praktischen Durchführbarkeit zu diesem Thema. Hierbei möchte ich auch einen großen Dank an Dr. Martin Hossann aussprechen. Er hat die Liposomen-Bereitstellung garantiert und die pharmakokinetische Auswertung betreut. Er hat mich mit seinen Ideen sehr bei dem Verfassen dieser Arbeit unterstützt und stand mir jederzeit zur Seite. Für die Liposomen-Herstellung und Bestimmung der DOX-Konzentration sowie pharmakokinetischen Auswertung möchte ich ebenfalls der gesamten Arbeitsgruppe Liposomen danken. Dr. Michael Peller danke ich für die Auswertung der umfangreichen Hyperthermie-Daten. Für die Bereitstellung des Hyperthermie-Gerätes und die technische Unterstützung möchte ich mich auch bei der Firma Dr. Sennewald Medizintechnik GmbH und Günter Futschik bedanken.

Zudem gilt ein großer Dank Dr. Katja Zimmermann und Dr. Karin Troedson die mir so engagiert geholfen haben, sei es bei der Patientenrekrutierung oder der Durchführung der Therapie und die ihr Wissen aus den vorangegangenen Studien mit mir geteilt haben. Auch dem gesamten onkologischen Team und allen Tierärzten und tiermedizinischen Fachangestellten, insbesondere Svenja Robortella, der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München, möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Betreuung der Studienpatienten danken. Ein besonderer Dank gilt hierbei auch Dr. René Dörfelt, der mich bei jeglichen Fragen und Problemen unterstützt hat.

Ein weiterer Dank gebührt Prof. Andrea Meyer-Lindenberg für die chirurgische Versorgung der Studienpatienten sowie Dr. Melanie Wergin für die strahlentherapeutische Behandlung der Studienkatzen. Ebenfalls möchte ich Dr. Andreas Brühshwein und Dr. Martin Zöllner für die Anfertigung und Auswertung der CT-Untersuchungen der Therapiegruppe II sowie die MRT-Untersuchungen des Patienten # I danken.

Bei Prof. Christine Baumgartner, Dr. Johannes Fischer und André Gürgen sowie dem gesamten Team des Zentrums für Präklinische Forschung möchte ich mich für die Unterstützung und Hilfe bei den PET-MRT bedanken.

Ein herzlicher Dank gebührt Silke Baer für die hervorragende Anästhesie bei den Therapiesitzungen und die sehr gute und enge Zusammenarbeit. Sie hat mich stets motiviert und inspiriert und ohne sie wären die langen Tage nur halb so schön gewesen.

Meiner Familie und meinem Verlobten André möchte ich nicht zuletzt auch einen herzlichen Dank für ihre Unterstützung und den Glauben an mich aussprechen. Ohne sie wäre es nicht möglich gewesen diese Arbeit zu vollenden.