

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Pferde
(Leitung: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Florian Jenner Dipl.ACVS Dipl.ECVS)

**Evaluierung der Behandlungsergebnisse von
Schimmelmelanomen mit dem caninen
Melanoma Impfstoff „Oncept“**

Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades
MAGISTRA MEDICINAE VETERINARIAE (Mag. med. vet.)

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Hannah Lamping

Wien, im September 2023

Betreuer: **Dr. med. vet. Edmund Hainisch PhD.**
Veterinärmedizinische Universität Wien
Department für Kleintiere und Pferde
Universitätsklinik für Pferde
Klinische Abteilung für Pferdechirurgie

Gutachterin: **Dr. med. vet. Sonja Berger, Dipl.ECEIM**
Veterinärmedizinische Universität Wien
Department für Kleintiere und Pferde
Universitätsklinik für Pferde
Klinische Abteilung für Interne Medizin Pferde

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst habe und keine anderen als die erwähnten Hilfsmittel und Literaturstellen einbezogen habe. Alle Passagen, die wörtlich oder sinngemäß aus der Literatur oder Internetquellen übernommen wurden, wurden mit Angaben der Quelle deutlich gemacht. Die Arbeit wird nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, 21. September 2023

(Ort, Datum)



(Unterschrift)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt und während meines Studiums begleitet haben.

Als erstes möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. med. vet. Edmund Hainisch PhD. für die Unterstützung und konstruktive Kritik bedanken.

Außerdem danke ich allen Teilnehmer:innen meiner Befragung, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und Alexander Lavrentik für den technischen und emotionalen Support während der letzten sechs Jahre.

Hannah Lamping
21. September 2023

Kurzfassung

Melanome beim Pferd sind eine ernst zunehmende Erkrankung, da sie mit der Zeit durch infiltratives Wachstum und Metastasierung zu lokalen Komplikationen wie z. B. Einschränkungen beim Kot- und Harnabsatz oder der Futteraufnahme führen und schmerzhaft sein können. Aus diesem Grund sollten sie behandelt werden, allerdings gibt es aktuell keine zu 100 % verlässlich wirksame Therapie. Beim Hund ist zur Therapie des oralen Melanoms die Oncept[®]-Impfung, eine xenogene DNA-Vakzine, welche für die humane Tyrosinase kodiert, zugelassen. Diese wurde auch schon beim Pferd zur Behandlung des equinen malignen Melanoms eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden retrospektiv die Daten von 15 Patienten ausgewertet welche den Impfstoff an der Veterinärmedizinischen Universität Wien zwischen 2016 und 2022 erhalten haben. Zusätzlich wurde eine Besitzer:innenbefragung durchgeführt um die Wirksamkeit und Verträglichkeit der Impfung, sowie die Zufriedenheit der Besitzer:innen zu evaluieren. Bei 25 % der Pferde ist es in Folge der Impfung zu einer Verkleinerung der Melanome gekommen, bei 75 % sind sie unverändert geblieben. Bei einem Pferd ist der Stridor, der durch die Melanome ausgelöst wurde, nach der Impfung nicht mehr aufgetreten. 20 % der Pferde haben trotz der Impfung an neuen Stellen Melanome entwickelt. Ein Pferd hat einmalig eine lokale Reaktion mit Schwellung an der Einstichstelle gezeigt, ansonsten erwies sich der Impfstoff als gut verträglich. Die Besitzer:innen gaben in der Umfrage an, zufrieden mit dem Preis-Leistungsverhältnis zu sein und alle waren bereit ihr Pferd weiter impfen zu lassen.

Schlagwörter: equines malignes Melanom, DNA-Vakzine, Pferd, Oncept[®]-Impfung

Abstract

Melanomas in horses are a serious disease, as over time metastasis and their infiltrative growth can lead to local complications such as pain or problems with defecation, urination or feed intake. For this reason, they should be treated, but there is currently no 100 % reliably effective therapy. In dogs, the Oncept[®]-vaccine, a xenogeneic DNA-vaccine encoding human tyrosinase, is approved for the treatment of oral melanoma. This vaccine has also been used in horses for the treatment of equine malignant melanoma. In the present study, data from 15 patients who received the vaccine at the University of Veterinary Medicine Vienna between 2016 and 2022 were retrospectively analyzed. In addition, an owner survey was conducted to evaluate the efficacy and safety of the vaccine, as well as the satisfaction of the owners. In 25 % of the horses there has been a reduction of melanomas following vaccination, in 75 % they remained unchanged. In one horse a stridor caused by the melanomas was observed, but did not recur after vaccination. 20 % of the horses developed melanomas at new sites despite vaccination. One horse showed a one-time local reaction with swelling at the injection site. Despite that the vaccine proved to be well tolerated. The owners stated in the survey that they were satisfied with the price-performance ratio and all were willing to continue the vaccinations.

Keywords: equine malignant melanoma, DNA-vaccine, horse, Oncept[®]-vaccine

Abkürzungsverzeichnis

ASIP	Agouti-Signalprotein
Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
EMM	equines malignes Melanom
eqIL-18	equines Interleukin-18
eqIL-12	equines Interleukin-12
hgp100	humanes Glykoprotein 100
HuTyr	humane Tyrosinase
irRC	immunrelated Response Criteria
MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor
NR4A3	nukleare Rezeptor Subfamilie 4, Gruppe A, Mitglied 3
RACK1	Rezeptor für aktivierte C Kinase 1
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
STX17	Syntaxin-17
TIS	Tierspitalinformationssystem
USDA	United States Department of Agriculture

Inhaltsverzeichnis

Eigenständigkeitserklärung	I
Danksagung	II
Kurzfassung	III
Abstract	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Nomenklatur	1
1.2 Physiologie	2
1.2.1 Rolle der Tyrosinase	2
1.3 Ätiologie	3
1.4 Klinische Symptome	4
1.5 Diagnose	5
1.6 Therapie	7
1.6.1 Chirurgische Exzision	7
1.6.2 Chemotherapie	8
1.6.3 Irreversible Elektroporation	8
1.6.4 Radiotherapie	9
1.6.5 Cimetidin	9
1.6.6 Betulinsäure	9
1.6.7 Immunotherapie	10
1.7 Hypothese	12
2 Material und Methode	13
2.1 Daten Analyse TIS	13
2.2 Erstellung des Fragebogens	13
2.3 Auswertung der Daten	15
3 Ergebnisse	16
3.1 Auswertung der Daten aus dem TIS	16
3.2 Ergebnisse der Umfrage	19
3.2.1 Vorherige Therapie	19

3.2.2	Verlauf und Auftreten neuer Melanome	19
3.2.3	Impfreaktionen	21
3.2.4	Verbleib der Pferde	21
3.2.5	Zufriedenheit der Besitzer:innen	22
4	Diskussion	23
4.1	Wirksamkeit	23
4.2	Verträglichkeit	25
4.3	Zufriedenheit	25
4.4	Fazit	26
4.5	Ausblick	26
	Tabellenverzeichnis	VII
	Abbildungsverzeichnis	VIII
	Literatur	XII
	Anhang A - Fragebogen	

1 Einleitung und Fragestellung

Melanome gehören nach dem equinen Sarkoid zu den häufigsten Hauttumoren beim Pferd [1]. Schon 1933 wurde beschrieben, dass 80 % der Schimmel über 15 Jahre Melanome zeigen [2] und auch in späteren Studien wurden Melanome bei 50 % der 296 untersuchten Schimmel im Alter von über 4 Jahren gefunden [3]. Aber auch bei Pferden mit anderen Fellfarben können Melanome auftreten [1]. Equine Melanome wurden lange Zeit als benigne eingestuft [4], in der neueren Literatur wird die Erkrankung aufgrund ihres infiltrativen Wachstums und der Neigung zur Metastasierung als equines malignes Melanom (EMM) bezeichnet [5]. In der Literatur ist beschrieben, dass bis zu 66 % der Melanome beim Pferd eine maligne Transformation durchmachen [6].

1.1 Nomenklatur

Grundsätzlich werden melanozytäre Tumore in gutartige (Melanozytome) und bösartige (Melanome) Formen eingeteilt. Anhand klinischer und histologischer Merkmale, sowie anhand des Tumorverhaltens, lassen sich vier Kategorien unterscheiden [7]:

- **Melanozytärer Naevus:** Hierbei handelt es sich um kleine solitäre Massen, die in der Epidermis oder oberflächlichen Dermis lokalisiert sind. Der Naevus tritt vor allem bei jungen Pferden unabhängig von der Farbe auf. Aufgrund seiner klinischen und histologischen gutartigen Merkmale, wird er als Melanozytom eingestuft [8].
- **Dermales Melanom:** Das dermale Melanom tritt als einzelne Umfangsvermehrung auf, meist bei jüngeren ausgewachsenen Schimmeln [7].
- **Dermale Melanomatose:** Die dermale Melanomatose kommt vor allem bei Pferden ab 15 Jahren oder älter vor. Sie ist gekennzeichnet durch multiple, oft konfluierende Massen, die häufig metastasieren [7].
- **Anaplastisches malignes Melanom:** Das anaplastische maligne Melanom ist eine seltenere Form, die vor allem ältere Nicht-Schimmel betrifft und durch schnelles Wachstum und ein heterogenes grau oder rosa-graues Muster auf der Tumoroberfläche gekennzeichnet ist. Es ist sehr aggressiv und kann innerhalb weniger Monate zum Tod führen [8].

Aufgrund ihrer Lage in tieferen Schichten der Dermis mit teils infiltrativem Wachstum und Metastasierung, werden das dermale Melanom, die dermale Melanomatose und das anaplastische maligne Melanom unter dem Begriff EMM zusammengefasst [8].

Zur Klassifizierung des EMM schlagen Moore et al. [5] eine Einteilung in fünf Grade nach zunehmender Malignität vor, siehe Tab. 1. Grad 0 bedeutet, dass keine Tumore vorhanden sind. Bei Grad 1 kommen nur einzelne, bei Grad 2 multiple Massen vor, die jeweils kleiner sind als 2 cm und dabei nur langsam wachsen. Grad 3 beschreibt multiple Umfangsvermehrungen mit einer Größe unter 4 cm und einer Größenzunahme von weniger als 25 % über Monate bis Jahre. Sind die Tumore größer als 4 cm und wachsen um mehr als 25 % innerhalb von Wochen bis Monaten, handelt es sich um Grad 4. Eine Metastasierung kann bei Grad 1 bis Grad 4 auftreten.

Tab. 1: Klinische Einteilung des EMM nach Moore et al. [5]

Grad	Anzahl der Tumore	Durchmesser	Wachstum	Metastasierung
0	keine	-	-	-
1	einzelne	< 2 cm	langsam (Durchmesser < 2 cm über Monate bis Jahre)	ja
2	multiple	< 2 cm	langsam (Durchmesser < 2 cm über Monate bis Jahre)	ja
3	multiple	< 4 cm	langsam (< 25 % Größenzunahme über Monate bis Jahre)	ja
4	multiple	> 4 cm	schnell (> 25 % Größenzunahme über Wochen bis Monate)	ja

1.2 Physiologie

Melanozyten sind dendritische Zellen, die von neuroektodermalen Melanoblasten abstammen und während der Embryogenese auswandern [9]. Sie kommen in der Basalschicht der Epidermis und in der äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel vor, wo sie vereinzelt zwischen den basalen Keratinozyten sitzen [8]. Melanozyten bilden das Pigment Melanin (Melanogenese), welches durch seine dunkle Farbe UV-Strahlung absorbiert und somit die Haut vor den schädlichen Auswirkungen der Sonnenstrahlung schützt [1]. Melanin findet man, abgesehen von der Haut, auch in Haaren und den Augen. Es wird nicht in den Melanozyten selbst gespeichert, sondern in Melanosomen verpackt und über die dendritischen Fortsätze an benachbarte Keratinozyten abgegeben [9].

1.2.1 Rolle der Tyrosinase

Die Tyrosinase ist ein kupferhaltiges Typ 1 Membranglykoprotein, das drei entscheidende Schritte der Melanogenese katalysiert [10]. Da sie einen wichtigen Angriffspunkt bei der Therapie des EMM darstellt, wird im Folgenden genauer auf ihre Funktion und ihr Vorkommen eingegangen.

Im Folgenden sind die durch die Tyrosinase katalysierten Reaktionen schrittweise angeführt:

- Schritt 1: Hydroxylierung von Tyrosin zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa)
- Schritt 2: Dehydrogenierung von Dopa zu Dopaoquinon
- Schritt 3: Dehydrogenierung von 5,6-Dihydroxyindol zu Melanochrom [10].

Die Hydroxilierung von Tyrosin zu Dopa wird hierbei als der die Syntheserate von Melanin bestimmende Schritt angesehen [11].

Die Expression der Tyrosinase ist räumlich und zeitlich begrenzt. Sie wird vermehrt in den Entwicklungsstadien von Melanozyten produziert. In reifen und inaktiven Melanozyten erfolgt eine Herunterregulierung. Im Tumorgewebe aller Arten von malignen Melanomen findet hingegen eine vermehrte Expression der Tyrosinase statt [12]. In einer Studie wurden auch bei Pferden erhöhte Konzentrationen an Tyrosinase in Melanomen im Vergleich zum normalem Gewebe gefunden [11].

1.3 Ätiologie

Melanome entwickeln sich aus normalen Melanozyten, die eine maligne Transformation durchgemacht haben. Wie genau es zur Melanombildung kommt, infolge derer die isoliert stehenden unpigmentierten Melanozyten Zellverbände aus pigmentierten Melanozyten bilden, ist noch nicht bis ins letzte Detail geklärt [9].

Während beim Menschen häufig die UV-Strahlung als Risikofaktor gesehen wird, scheint dies bei Pferden nicht die Ursache zu sein. Prädilektionsstellen, wie die Schweifunterseite, sind zum Teil vor der Sonneneinstrahlung geschützt und außerdem bietet die Haut von Schimmeln durch ihre dunkle Pigmentierung guten Schutz vor einer Schädigung durch die UV-Strahlung [8].

In einer Studie mit 296 Lippizanern wurde untersucht, ob die Entstehung von Melanomen beim Schimmel erblich bedingt ist. Diese ergab eine geschätzte Heritabilität von $0,36 \pm 0,11$. Dies weist darauf hin, dass die Tumorentwicklung möglicherweise durch mehrere Gene beeinflusst wird [3]. Einige Rassen wie Araber, Lippizaner, Vollblutpferde und Percheron scheinen genetisch prädisponiert zu sein, allerdings kann dies auch auf den hohen Anteil an Schimmeln innerhalb dieser zurückzuführen sein [1].

Schimmel werden als Rappen, Braune oder Fuchse geboren, aber mit der Zeit kommt es zu einer fortschreitenden Depigmentierung der Haare, während die dunkle Pigmentierung der Haut bestehen bleibt. In einem Alter von 6-8 Jahren werden die Schimmel meist weiß [13]. Das sogenannte Ergrauen ist ein autosomal-dominant vererbtes Merkmal. Homozygote Pferde ergrauen schneller und gleichmäßiger verglichen mit Heterozygoten und weisen gleichzeitig eine höhere Inzidenz an Melanomen und Vitiligo auf [13]. Ursächlich ist eine Mutation, genauer eine 4,6 kb große Duplikation des Gens Syntaxin-17 (STX17). STX17 und das benachbarte Gen nukleare Rezeptor Subfamilie 4, Gruppe A, Mitglied 3 (NR4A3) werden in melanozytären Tumoren bei Schimmeln überexprimiert und führen so vermutlich zu einer verstärkten Melanozytenproliferation [13].

Eine weitere Mutation, welche eine Rolle bei der Entstehung von Melanomen spielt, ist die Loss-of-Function-Mutation des Agouti-Signalprotein (ASIP), welche häufig bei Lippizanern vorkommt. ASIP fungiert als ein Antagonist am Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R). Fällt diese Hemmung am MC1R infolge der Mutation weg, führt dies zu einer vermehrten Proliferation der Melanozyten und fördert somit die Entstehung von Melanomen [14]. Mutationen beim Schimmel die zur Entwicklung von Melanomen führen, bewirken vermutlich auch eine Hochregulierung von Genen wie der Tyrosinase [11].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Zusammenhang zwischen dem Phänotyp des Ergrauens und der Entwicklung melanozytärer Tumore belegt ist, aber die genauen molekularen Mechanismen bislang unbekannt sind [8]. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist notwendig und kann einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung einer gezielten und effektiven Therapie leisten [5].

1.4 Klinische Symptome

Melanome sind als dunkle, grau oder schwarz pigmentierte Knoten oder Plaques auf der Haut zu erkennen, die einzeln, in Clustern oder an verschiedenen Lokalisationen am Körper zu finden sind [14]. Seltener treten auch amelanotische Melanome auf, diese sind unpigmentiert und können sowohl bei Schimmeln als auch bei Nicht-Schimmeln vorkommen. Die Umfangsvermehrungen können in der oberflächlichen Dermis oder in den tieferen Hautschichten liegen. Ihre Oberfläche kann in Folge des Wachstums ulzerieren oder es können nekrotische Areale entstehen, wenn Teile infolge eines schnellen Tumorwachstums von der Blutzufuhr abgeschnitten werden [1]. Das Auftreten korreliert beim Schimmel mit dem Prozess des Ergrauens, weshalb die ersten Melanome in einem durchschnittlichen Alter von 7,4 Jahren auftreten [15]. Bei Schimmeln unter 5 Jahren sind selten Melanome zu finden [1]. Mit zunehmendem Alter hingegen steigt die Inzidenz, ab einem Alter von 15 Jahren sind bis zu 80 % der Schimmel betroffen. Mcfadyean [2] stellte 1933 die Hypothese auf, dass alle Schimmel im Alter Melanome entwickeln würden, sollten sie lange genug leben. Auch andere Autoren beschreiben ein lineares Fortschreiten der Erkrankung mit zunehmenden Alter. Als Richtwert ist davon auszugehen, dass die Erkrankung um bis zu 0,3 Grade pro Jahr fortschreitet [14].

Auch bei anderen Fellfarben können Melanome auftreten, in diesem Fall weisen diese häufig eine höhere Malignität auf und zeigen eine frühere Metastasierung [3]. Dies ist vermutlich auf eine höhere Aktivität der Melanozyten zurückzuführen [6].

Melanome beim Schimmel zeigen ein langsames invasives Wachstum und metastasieren häufig mit fortschreitender Erkrankung [15]. Ob es sich bei multiplen Melanomen beim Pferd um Metastasen handelt oder um multizentrische, separate Neoplasien, ist bislang unklar [5]. Zu

Beginn der Erkrankung finden sich meist solitäre kleine dermale Massen, häufig in der Nähe von haarlosen Stellen [16]. Typische Prädispositionstellen sind an der Schweifunterseite, in der perianalen Gegend und im Bereich der äußeren Genitalien. Außerdem wurde das Vorkommen von Melanomen im Bereich der Parotis, an den Augenlidern, Gliedmaßen, Lippen, Ohren, am Hals oder an den inneren Organen (viszerale Melanomatose) beschrieben [6]. Metastasen können hämatogen oder lymphogen in den inneren Organen, regionalen Lymphknoten, Knochenmark, Mesenterium, aber auch den Skelettmuskeln entstehen [15].

Die klinischen Symptome variieren in Abhängigkeit von der Lokalisation. Melanome im Bereich des Kopfes oder der Sattellage können ulzerieren und zu Schwierigkeiten beim Tragen der Trense oder des Sattels führen und so die Nutzbarkeit als Reitpferd einschränken [6]. Große Tumore können aufgrund ihrer Lage Probleme beim Fressen, Urinieren (Dysurie), Kotabsatz (Dyschezie), sowie bei der Fortpflanzung verursachen [5]. Kommen intraabdominale Metastasen dazu, kann dies zu Gewichtsverlust, Verstopfungen bis hin zu Koliken infolge von Obstruktionen des Gastrointestinaltraktes führen. Bei einer Kompression des Rückenmarks oder peripherer Nerven durch Metastasen können neurologische Symptome wie Lahmheiten, Ataxien und Paresen auftreten, in seltenen Fällen wurde auch das Auftreten eines Horner Syndroms beschrieben [1].

Zu Beginn verhalten sich die Melanome klinisch meist benigne, bleiben sie unbehandelt, machen bis zu 66 % mit der Zeit eine maligne Transformation mit lokalinvasivem Wachstum und weitreichender Metastasierung durch [1]. Bislang wurden keine Studien zur Lebenserwartung nach der Diagnose EMM beim Pferd durchgeführt. Der Verlauf ist jedoch anders als beim Mensch oder Hund, bei denen massive Metastasierung zu lebensbedrohlichen Zuständen führt. Beim Pferd kommt es häufig zur Euthanasie in Folge von lokalen Komplikationen (z. B. große perianale Melanome die Probleme beim Kotabsatz machen, ulzerieren und sich infizieren können und schmerzhaft sind) [1]. Melanome bei Nicht-Schimmeln weisen allerdings eine höhere Malignität auf [3].

1.5 Diagnose

Um zu der Diagnose EMM zu kommen, sind häufig die Nationale und das klinische Erscheinungsbild ausreichend. Im Zweifel kann diese durch eine zytologisch-histologische Untersuchung von Biopsien oder Feinnadelaspiraten gesichert werden [15]. Schwieriger gestaltet sich die Diagnose bei amelanotischen Tumoren. In diesem Fall kann ergänzend zur pathohistologischen Untersuchung eine Immunhistochemie durchgeführt werden [8]. Einen geeigneten Marker hierzu stellt der Rezeptor für aktivierte C Kinase 1 (RACK1) dar. Dieser wird in Zellen des EMM überexprimiert. Da er nicht in gesunden Melanozyten vorkommt, ist damit auch eine

Unterscheidung zwischen benignen melanozytären Tumoren und malignen Melanomen möglich [17]. Ein weiterer Marker mit einer hohen Sensitivität und Spezifität für melanozytäre Tumore ist PNL2, ein monoklonaler Antikörper [18].

Bei Nicht-Schimmeln sollte immer eine histologische Untersuchung durchgeführt werden, da die Melanome bei diesen vermutlich eine höhere Malignität aufweisen [8]. Eine histopathologische Differenzierung zwischen benignen und malignen Melanomen ist allerdings nicht immer möglich [15]. In frühen Stadien ist es schwierig Tumorzellen von Melanozyten zu unterscheiden. Mit Fortschreiten der Erkrankung und dem Verlust von Zelldifferenzierung und Pigmentierung ist es schwierig, den melanozytären Ursprung des Tumors zu erkennen [8]. Bislang gibt es kein diagnostisches Verfahren, das alleine in der Lage ist, sicher zwischen malignen und benignen melanozytären Neoplasien zu differenzieren oder eine genaue Prognose zur Lebenserwartung zu stellen [9].

Eine rektale Palpation kann Aufschluss darüber geben, ob intraabdominale Metastasen vorliegen oder Einschränkungen beim Kotabsatz durch die Melanome bestehen. Ist die Region der Parotis betroffen, ist auch eine endoskopische Abklärung zur Untersuchung der Luftsäcke sinnvoll und, um gegebenenfalls Obstruktionen der oberen Atemwege festzustellen [15].

Treten unspezifische Krankheitssymptome infolge einer Metastasierung, z. B. Abmagerung, Kolik, Leistungsschwäche auf, ist weitere Diagnostik notwendig. Mittels Ultraschall können der Thorax und das Abdomen untersucht werden, vom Thorax können außerdem Röntgenaufnahmen angefertigt werden [15]. In der Hämatologie zeigen sich häufig unspezifische Veränderungen wie Neutrophilie, erhöhte Immunglobuline, Leukozytose, Thrombozytose und erhöhtes Fibrinogen aufgrund der Entzündungsreaktion in Folge der Tumoren [1]. Finden sich Neutrophile mit phagozytierten Melaningranula, ist dies ein Hinweis darauf, dass bereits eine Metastasierung stattgefunden hat [19].

Das Ziel der Diagnosestellung ist es, eine möglichst genaue Prognose abgeben und die Therapiemöglichkeiten entsprechend an den Patienten anpassen zu können. Je früher die Diagnose gestellt wird, desto höher sind die Chancen auf eine erfolgreiche Therapie [8]. Um eine möglichst genaue Prognose stellen zu können, ist eine Klassifizierung des Erkrankungsstadiums sinnvoll [5]. Moore et al. [5] raten außerdem die Besitzer:innen aufzuklären und aufzufordern, ihr Pferd regelmäßig auf das Auftreten neuer Massen zu untersuchen und die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore zu evaluieren.

Mögliche Differentialdiagnosen zum EMM sind noduläre Sarkoide, kutane Lymphome, parasitäre Zysten, Hämangiome, Mastzelltumore, Fibrome, Erkrankungen der Parotis und des Luftsacks, sowie Granulome durch *Gasterophilus spp.* [20].

1.6 Therapie

Früher wurden Melanome beim Schimmel als harmlos eingestuft und dementsprechend nicht behandelt solange sie keine Probleme machten [8]. Mittlerweile ist bekannt, dass ein frühes Eingreifen sinnvoll ist, um ein weiteres Wachstum und die Entwicklung zu malignen Formen zu verhindern. Außerdem erhöhen sich dadurch die Chancen auf eine erfolgreiche Therapie [1]. Tab. 2 zeigt eine Übersicht der möglichen Therapieansätze bei der Behandlung des EMM. Es gibt keine allgemein anwendbare Therapie und es ist bislang keine Heilung möglich [14]. Das Ziel ist es, so früh wie möglich einzugreifen, da sich die Neoplasien am Anfang meist noch klinisch benigne verhalten und ein frühes Eingreifen nicht den Übergang zur malignen Form mit aggressiverem Wachstum fördert, wie bei anderen Tumorarten beschrieben [21].

Als allgemeine Richtlinie rät MacKay [14], abhängig vom Grad der Erkrankung, eine oder mehrere Therapieformen zu kombinieren. Bei Grad 1 und 2 sollten leicht zugängliche einzelne Massen zumindest einmal im Jahr chirurgisch entfernt werden. Ab Grad 3 sollten lokale und systemische Therapieansätze kombiniert werden und eine palliative Versorgung mittels Radiotherapie für große chirurgisch nicht-zugängliche Melanome in Betracht gezogen werden.

Tab. 2: Darstellung der Therapiemöglichkeiten bei EMM nach Pimenta, Prada und Cotovio [8]

Behandlungen								
Chirurgisch	Chemotherapie	Electroporation	Oral	Topisch	Radiotherapie	Immunotherapie	bakterielle Produkte	Proteasomen Inhibition
konventionelle Chirurgie Kryochirurgie Laserchirurgie	Cisplatin ergänzende Therapien: Electrochemotherapie Hyperthermie	mit Calcium irreversible	Cimetidin	Betulinsäure	Teletherapie Brachytherapie Elektronische Brachytherapie	intratumoral systemisch		Amblyomin X

1.6.1 Chirurgische Exzision

Die chirurgische Exzision kann erfolgreich bei kleineren solitären Melanomen eingesetzt werden [22]. Eine Studie zeigte, dass auch größere (4-20 cm) Melanome erfolgreich chirurgisch entfernt werden konnten, ohne dass es zu einem Rezidiv über einen mittleren Follow-up Zeitraum von 39 Monaten kam [23]. Wichtig ist, den Tumor im Ganzen zu entfernen, da sonst das Risiko eines erneuten Wachstums, sowie einer Metastasierung besteht [24]. Bei Nicht-Schimmeln ist es aufgrund der vermuteten höheren Malignität ratsam, mehr vom umliegenden Gewebe zu entfernen, um sicherzugehen, dass keine neoplastischen Zellen zurückbleiben [8]. Die Befürchtung, durch den Eingriff das Tumorwachstum zu fördern, kann nicht belegt werden und gilt als überholt [25]. Viel mehr zeigte eine bislang unveröffentlichte Studie, dass ein frühes und radikales Eingreifen mit Entfernung aller auftretenden Melanome im Vergleich zur Kontrollgruppe, die auf Besitzerwunsch keine Therapie erhielt, einen Vorteil brachte [25]. Ist eine vollständige Exzision aufgrund der Lokalisation des Melanoms nicht möglich, kann versucht

werden, möglichst große Teile zu entfernen (Debulking) und zusätzlich resorbierbare Implantate mit Cisplatin oder Carboplatin an den Schnittträgern einzusetzen [25]. Als Alternative zur klassischen Chirurgie ist auch eine Entfernung mithilfe von Kryochirurgie oder mithilfe eines CO₂-Lasers möglich [14].

Jedoch sind häufig mehrere Eingriffe über die Zeit notwendig [6] und die Entfernung der Melanome verhindert auch nicht das Fortschreiten der Erkrankung [5].

1.6.2 Chemotherapie

Melanozytäre Tumore sprechen allgemein schlecht auf Chemotherapie an und benötigen hohe Dosen an Wirkstoff [8]. Zum Einsatz kommen z. B. Cisplatin oder Carboplatin. Aufgrund der toxischen Eigenschaften der Wirkstoffe, erfolgt die Applikation lokal, entweder als Injektion einer Cisplatin-Sesamöl-Emulsion oder in Form von Polymer Matrizen, die langsam den Wirkstoff freisetzen. Patienten die mit resorbierbaren Cisplatin Implantaten, zum Teil in Kombination mit Debulking, behandelt wurden, waren in einer Studie mindestens zwei Jahre Rückfall frei [26]. Allerdings handelt es sich auch hierbei um eine lokale Therapie, die keinen Einfluss auf das Wachstum der Melanome an anderen als den behandelten Stellen hat [27].

Die Erfolgsrate nach einer viermal alle zwei Wochen verabreichten intratumoralen Cisplatin-Injektion liegt bei 81 %. Sie ist jedoch geringer bei größeren und weiter fortgeschrittenen Tumoren und Melanomen, bei denen zuvor schon ein Behandlungsversuch mit einer anderen Therapieform stattgefunden hat. Außerdem sind nach der Therapie Melanome an anderen als den behandelten Stellen aufgetreten [27].

Aufgrund der karzinogenen und mutagenen Eigenschaften ist der Einsatz von Cisplatin nur eingeschränkt möglich und erfordert die strikte Einhaltung von Sicherheitsmaßnahmen [15, 27].

Mithilfe von Elektrochemotherapie ist es möglich die Effektivität zu erhöhen. Durch pulsierende elektrische Impulse entstehen kleine Poren in den Zellmembranen, durch welche der Wirkstoff, z. B. Cisplatin, in die Zellen gelangt und diese schädigt. Eine Anwendung ist unter Sedierung auch im Feld möglich [28].

1.6.3 Irreversible Elektroporation

Bei der irreversiblen Elektroporation werden die Zellmembranen durch elektrische Impulse irreversibel geschädigt, wodurch es zum Zelluntergang kommt. Es handelt sich um eine neue Therapieform, die bisher nur bei zwei Pferden mit Melanomen angewendet wurde und die Tumorgöße um 52 % und 99 % reduzierte. Der Vorteil der irreversiblen Elektroporation ist, dass sie im Stehen mit Sedierung auch vor Ort beim Besitzer angewendet werden kann und ohne den Einsatz toxischer Wirkstoffe auskommt [29].

1.6.4 Radiotherapie

Die Radiotherapie kommt aus logistischen und Sicherheitsgründen beim Pferd selten zum Einsatz [8]. Man unterscheidet die Tele- und die Brachytherapie. Bei der Teletherapie wird die ionisierende Strahlung von einer externen Quelle aus gesendet, meist sind mehrere Anwendungen nötig und das Pferd muss hierfür in Narkose sein [1]. Sie findet z. B. Anwendung bei der palliativen Behandlung von Tumoren im Kopf- und Halsbereich von Pferden [14]. Bei der Brachytherapie wird die Strahlungsquelle innerhalb des Tumors oder in Kontakt mit diesem eingesetzt und es sind nur eine oder wenige Behandlungen nötig, was ein Vorteil gegenüber der Teletherapie ist [1].

Die Radiotherapie stellt eine gute Option für Pferde dar, bei denen die Chemotherapie nicht gewirkt hat oder eine chirurgische Exzision nicht erfolgreich war [8].

1.6.5 Cimetidin

Die orale Gabe des H₂-Histamin-Antagonisten Cimetidin (2,5 mg/kg Körpergewicht alle 8 h) führte in einer Studie aus dem Jahr 1990 zur Verkleinerung der Melanome und konnte das Wachstum in zwei von drei Fällen aufhalten [30]. In späteren Studien mit mehr Pferden konnten diese Ergebnisse allerdings nicht reproduziert werden [31, 32]. Auch andere Autoren berichten keine Tumorreduktion, auch bei Einsatz von Cimetidin über einen längeren Zeitraum, beobachtet zu haben [25]. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass sich EMM bei jedem Pferd unterschiedlich äußert und die Melanome deshalb je nach Pferd unterschiedlich gut auf die Therapie ansprechen [31].

Da jedoch selten eine spontane Tumorregression bei Melanomen beobachtet wird, sollte dieser Ansatz laut MacKay [14] nicht außer Acht gelassen werden und in Kombination mit weiteren Therapien untersucht werden. Um eine Dosis, die mit der beim Menschen eingesetzten vergleichbar ist, zu erreichen, müsste die applizierte Menge auf 48 bis 72 mg/kg/d erhöht werden [14].

1.6.6 Betulinsäure

In vitro wurde beobachtet, dass equine Melanomzellen bei Kontakt mit Betulinsäure in Apoptose gehen. Topisch können Betulinsäure oder ihr Derivat NVX-207 angewendet werden, beide zeigen antiproliferative und zytotoxische Effekte bei der Applikation auf equine Melanome [33]. In einer ersten Studie hat der Einsatz einer 1%igen Creme zweimal täglich über 13 Wochen eine kontinuierliche Verkleinerung der Melanome bewirkt. Allerdings sind noch weitere größere Studien notwendig, um ein geeignetes Protokoll für die Anwendung zu erstellen und die Wirksamkeit zu bestätigen [34].

1.6.7 Immunotherapie

Melanome weisen eine hohe Immunogenität auf, deshalb ist der Ansatz der Immunotherapie naheliegend [15]. Unterschieden werden hierbei die nicht spezifische (indirekte) Immuntherapie, die durch Stimulation des Immunsystems (z. B. Cimetidin) wirkt, und die spezifische Antitumor-Therapie. Bei dieser werden tumor-assoziierte Antigene eingesetzt, was den Vorteil hat, dass ausschließlich Tumorgewebe angegriffen wird. Es gibt die Möglichkeit die Immunotherapie lokal oder systemisch einzusetzen [1].

Zur lokalen Therapie ist eine intratumorale Injektion von Plasmiden, die für die Zytokine equines Interleukin-12 (eqIL-12) und equines Interleukin-18 (eqIL-18) codieren, möglich [35]. Diese haben antitumorale Effekte durch die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, die Produktion von Interferon-gamma und der Induktion der Apoptose in Tumorzellen. In einer Studie kam es nach der Anwendung zu einer signifikanten Reduktion der Tumorgröße. Um den Effekt der Therapie zu verstärken, schlagen Müller et al. [35] außerdem eine Kombination mit Elektroporation vor.

In einer weiteren Studie wurde eine Kombination aus IL-12 und IL-18 eingesetzt und ebenfalls ein Rückgang der Melanome beobachtet [36]. Auch die nicht-behandelten Tumore zeigten eine Größenreduktion, dies lässt auch auf einen systemischen Effekt schließen. Infolge der intradermalen Applikation ist eine lokale Entzündungsreaktion aufgetreten, außerdem zeigten die Pferde am Tag nach der Injektion eine erhöhte innere Körpertemperatur. Beides trat nur vorübergehend auf und beeinträchtigt die Sicherheit der Vakzine laut Mählmann et al. [36] nicht.

Das Ziel der systemischen Immunotherapie ist es, eine Immunantwort gegen die Zellen des Tumors zu erzielen, die zu einer Regression der Primärtumoren und der Metastasen führt. Es gibt zwei Arten von Vakzinen mit denen dies erreicht werden kann, die autologe Vakzine und die DNA-basierte Vakzine [1].

Für die Herstellung der autologen Vakzine werden aus chirurgisch entfernten Melanomen ganze Tumorzellen isoliert und dann *in vitro* zu einer Vakzine verarbeitet [8]). In zwei Studien an Pferden mit Melanomen wurde die Wirksamkeit überprüft und in beiden wurde eine Tumorrogression beobachtet. Aufgrund der nur geringen Anzahl an Pferden und, da bei beiden zusätzlich noch andere Therapien zum Einsatz kamen, ist es schwer, aufgrund dieser eine Aussage über die Wirksamkeit zu treffen [1]. Außerdem ist die Herstellung der autologen Vakzine sehr kosten- und arbeitsintensiv, auch dies könnte ein Grund dafür sein, dass sie nicht häufiger in der Therapie des EMM zum Einsatz kommt [15].

Der erste Schritt in der Entwicklung einer DNA-basierten Vakzine ist es, tumor-assoziierte Antigene zu identifizieren, die als Angriffspunkt für eine Immunreaktion des Körpers dienen können. Diese DNA-Sequenz wird amplifiziert und in einen Vektor eingebracht, um *in vivo* eine Expression des Proteins hervorzurufen. Der Vektor selbst hat auch immunstimulierende Eigenschaften, um die Effektivität des Impfstoffs weiter zu erhöhen [8].

Ein mögliches Ziel für diese Art der Vakzine stellt das Protein Tyrosinase dar. Diese ist, wie früher beschrieben, ein entscheidendes Enzym für die Melaninproduktion. Tyrosinase wird ausschließlich in Melanozyten exprimiert und kommt vermehrt in neoplastischen Melanozyten vor, weshalb es ein gut geeignetes tumor-assoziiertes Antigen darstellt [12].

Zur Krebsbehandlung beim Mensch und auch beim Hund wurden bereits xenogene, d.h. die verwendete DNA entstammt einer anderen Spezies, DNA-basierte Vakzinen entwickelt und optimiert [12].

Beim Hund ist mit der Oncept[®]-Impfung (Merial Ltd., Athens, GA) bereits eine solche zur Behandlung des Stage 2-4 Melanoms in Kombination mit lokaler Kontrolle wie chirurgischer Exzision vom United States Department of Agriculture (USDA) zugelassen [37]. Auch beim Pferd lieferten erste Studien zum Einsatz von Oncept[®] beim EMM erfolgsversprechende Ergebnisse [12]. Die Impfung enthält ein Plasmid welches für das Protein humane Tyrosinase (HuTyr) kodiert. Sie nutzt damit die enge Homologie zwischen der humanen und der caninen (92 %) bzw. equinen (90 %) Tyrosinase aus [1].

Verabreicht wird die Oncept[®]-Impfung i. m. mittels nadelfreier Injektion, welche von Phillips et al. [38] für die Anwendung beim Pferd evaluiert wurde. Der Vorteil dieser Applikationsart gegenüber einer Injektion mit einer Nadel, ist die weitere Verteilung des Wirkstoffs im Gewebe und die daraus resultierende größere Immunitätsbildung. Aus diesem Grund ist die nadelfreie Injektion besonders gut geeignet für die Applikation von DNA-Vakzinen, welche eine relativ geringe Immunogenität aufweisen. Vierundzwanzig Stunden nach der Injektion trat bei allen Patienten ein leichtes Ödem in der Pektoralmuskulatur ventral der Applikationsstelle auf, dieses bildete sich jedoch innerhalb eines Tages fast vollständig zurück. Es wurden keine Schmerzreaktionen beobachtet, lediglich zwei Pferde erschrecken durch das Geräusch, das bei der Injektion entsteht [38].

Zusätzlich wurde in einer weiteren Studie auch die Immunitätsbildung untersucht. Die Vakzine konnte bei allen der fünf gesunden und melanomfreien Pferde sowohl eine signifikante humorale, als auch eine zellmedierte Immunreaktion hervorrufen. Abgeleitet vom Impfschema beim Hund, wurde mit 0,4 ml (100 µg) des xenogenen Plasmid DNA Impfstoffs kodierend für HuTyr viermal im Abstand von jeweils zwei Wochen geimpft [12]. Nach dem off-label Einsatz der Vakzine bei mehr als 50 Pferden mit EMM beschreiben Phillips und Lembcke [1] bei den meisten Pferden eine Reduktion der Tumorgroße.

In einer anderen Studie wurde der Einsatz einer Kombination aus eqIL-12 und eqIL-18 und HuTyr und humanes Glykoprotein 100 (hgp100) getestet [36]. In allen Gruppen kam es zu einer durchschnittlichen Reduktion der Tumorgröße um 28,5 % nach 120 Tagen. Allerdings gab es keinen Unterschied, wenn zusätzlich zum eqIL-12 oder eqIL-18 noch hgp100 oder HuTyr eingesetzt wurde und es wurde auch keine spezifische Immunitätsbildung gegen die HuTyr beobachtet.

Neben den hier genannten gibt es noch weitere Ansätze zur Immunotherapie des EMMs, die aber bisher nur an einer geringen Anzahl an Patienten eingesetzt wurden. Auch wenn noch weitere Forschung notwendig ist, ist davon auszugehen, dass in der Zukunft die Immunotherapie allein oder in Kombination mit konventionellen Therapien eine Rolle bei der Heilung des EMMs spielen wird [39, 8].

1.7 Hypothese

In den letzten Jahren wurden einzelne Patienten mit anders nicht-therapierbaren Melanomen im Rahmen des off-label Gebrauchs an der Pferdeklinik der Veterinärmedizinischen Universität Wien mit der Oncept[®]-Impfung behandelt. Die Patientendaten sollen nun in dieser Arbeit retrospektiv ausgewertet werden. Hierzu werden die Eingaben aus dem Tierspitalinformationssystem (TIS) sowie die Antworten der Besitzer:innen aus einer Befragung verarbeitet.

Die Hypothese lautet, dass der Einsatz der xenogenen DNA-Vakzine Oncept[®] zu einer klinischen Verbesserung der Melanome bei den Pferden geführt hat. Neben der Evaluierung der Behandlungsergebnisse, soll außerdem geklärt werden, ob die Impfung gut vertragen wurde und wie die Zufriedenheit der Besitzer mit der Therapie ist.

2 Material und Methode

2.1 Daten Analyse TIS

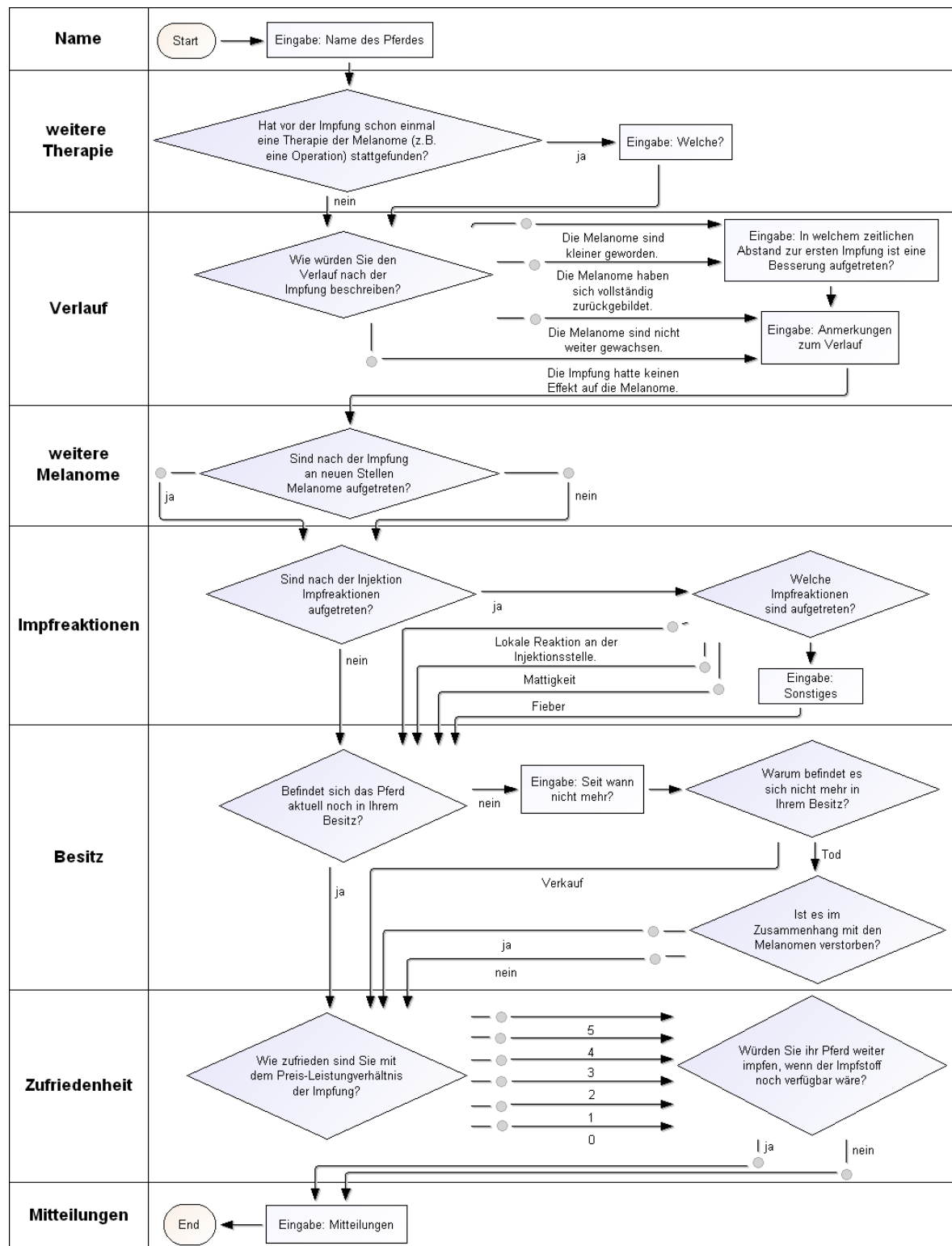
Um eine Liste mit allen Patienten zu erstellen, die die Oncept[®] Impfung erhalten haben, wurde eine Abfrage im TIS durchgeführt. Alter, Geschlecht, Rasse und Farbe wurden in eine Tabelle eingetragen. Anschließend wurden die Patientenakten durchgesehen und alle Einträge im Zusammenhang mit dem Schimmelmelanom, wie Befunde der klinischen Untersuchungen, Einträge zum klinischen Verlauf und eventuelle Therapien, z. B. Operationen, in einer Excel-Tabelle gesammelt. Außerdem wurden das Datum und die Anzahl der erhaltenen Impfungen, sowie Einträge zu der Verträglichkeit der Impfung notiert. Da in den Patientenakten im TIS nicht bei allen Patienten Vermerke über den Verlauf verfügbar waren, wurde zusätzlich noch eine Besitzer:innenbefragung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Namen und E-Mail-Adressen der Besitzer:innen der geimpften Pferde aus dem TIS in eine Excel-Tabelle übernommen, um sie im Rahmen der Umfrage zu kontaktieren.

2.2 Erstellung des Fragebogens

Mithilfe einer Besitzer:innenbefragung wurden weitere Informationen zur Entwicklung der Melanome nach Impfung, zur Verträglichkeit der Impfung, aber auch zur Zufriedenheit der Besitzer:innen gesammelt. Der Fragebogen wurde zunächst in Word formuliert und nach Besprechung in das Online Umfrage Tool «Limesurvey»¹ übertragen, siehe *Anhang A - Fragebogen*. Dort wurden alle Fragen bis auf die Felder für Kommentare als Pflichtfragen festgelegt. Einige Fragen wurden als Folgefragen deklariert, damit sie nur bei der Auswahl bestimmter Antworten erscheinen. Insgesamt sind es 16 Fragen, wobei zehn von allen zu beantworten waren und sechs nur bei der Auswahl bestimmter Antworten angezeigt wurden. In Abb. 1 ist der Aufbau der Umfrage dargestellt.

Der Link zu der Umfrage wurde per E-Mail durch Dr. Hainisch an die Besitzer:innen verschickt. In dieser E-Mail wurden die Besitzer:innen über den Zweck der Umfrage aufgeklärt und informiert, dass die Lieferung der Oncept[®] Impfung nach Europa vom Hersteller zu dem Zeitpunkt eingestellt wurde. Es wurden keine persönlichen Daten der Besitzer:innen im Rahmen der Umfrage abgefragt oder gespeichert.

¹<https://www.limesurvey.org/de/>

Abb. 1: Aufbau der Umfrage¹¹erstellt mit „Bee-Up“ OMILAB NPO© 2023

2.3 Auswertung der Daten

Die Daten aus der Umfrage wurden in Form einer Excel-Datei gespeichert, um sie weiter zu verarbeiten. Da es sich um Daten von insgesamt 15 Patienten, die die Impfung erhalten haben, handelt, wurde eine deskriptive statistische Analyse mit Microsoft Excel durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der Daten aus dem TIS

Im Zeitraum von September 2016 bis Juni 2022 wurden 15 Patienten an der Pferdeklinik der Veterinärmedizinischen Universität Wien mit der Oncept® Impfung behandelt. Das Alter der Patienten lag zwischen 11 und 20 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 14,8 Jahre. 14 Pferde waren Schimmel (inklusive ein Braunschimmel und ein Forellenschimmel), ein Pferd, war ein Schwarzbrauner. Bei dem Großteil der Pferde handelte es sich um Warmblüter, zwei waren Vollblüter. Acht Pferde waren Stuten, zwei Wallache und fünf Hengste. Es waren sowohl Freizeitpferde, eine Zuchtstute und Sportpferde vertreten (Tab. 3).

Tab. 3: Nationale der Patienten

Pferd	Alter	Farbe	Rasse	Geschlecht	Verwendung
1	14	Schimmel	Warmblut	Stute	Springpferd
2	15	Schimmel	Lusitano	Wallach	Freizeitpferd
3	13	Schimmel	Lippizaner	Stute	Zuchtpferd
4	15	Schimmel	belgisches Warmblut	Hengst	Springpferd
5	13	Schimmel	Warmblut	Stute	Reitpferd
6	20	Schimmel	Araber	Stute	Freizeitpferd
7	17	Schimmel	Cruzado	Hengst	Schulpferd
8	14	Braunschimmel	arabisches Vollblut	Hengst	Freizeitpferd
9	12	Schwarzbrauner	Warmblut	Stute	Dressurpferd
10	16	Schimmel	Holsteiner	Stute	Vielseitigkeitspferd
11	11	Forellenschimmel	tschechisches Warmblut	Wallach	Springpferd
12	18	Schimmel	Lippizaner	Hengst	Freizeitpferd
13	18	Schimmel	österreichisches Warmblut	Stute	Freizeitpferd
14	14	Schimmel	Holsteiner	Stute	Reitpferd
15	12	Schimmel	Lusitano	Hengst	Dressurpferd

Geimpft wurde nach folgendem Schema: vier Impfungen zur Grundimmunisierung im Abstand von jeweils zwei Wochen und dann halbjährliche Auffrischungsimpfungen. Eine Abweichung vom Impfschema gab es bei Pferd 9, welches nach der Grundimmunisierung alle drei Monate geimpft wurde. Bei Pferd 10 erfolgte die 1. Auffrischungsimpfung erst nach acht Monaten. Pferd 15 wurde nur dreimal grundimmunisiert, alle anderen Pferde haben eine vollständige Grundimmunisierung mit vier Impfungen erhalten (Tab. 4).

Sieben Pferde (Pferd 2, 5, 7, 11, 12, 13 und 14; 47 %) haben keine Auffrischungsimpfungen nach der Grundimmunisierung bekommen. Im Schnitt wurden die Patienten 5,7 Mal geimpft.

Die meisten Impfungen hat Pferd 1 erhalten (11) und die wenigsten Pferd 15 (3) (Tab. 5).

Tab. 4: Übersicht über die pro Pferd durchgeführten Impfungen

Pferd ↘	Grundimmunisierung				Auffrischungsimpfungen						
	1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
1	Nov 16	Nov 16	Dez 16	Dez 16	Jun 17	Nov 17	Jun 18	Dez 18	Jun 19	Nov 19	Nov 20
2	Feb 19	Mrz 19	Mrz 19	Apr 19							
3	Nov 19	Nov 19	Dez 19	Jan 20	Jun 20	Dez 20	Jun 21	Feb 22			
4	Jan 20	Feb 20	Feb 20	Mrz 20	Okt 20	Apr 21	Okt 21	Apr 22			
5	Mai 20	Jun 20	Jun 20	Jun 20							
6	Jul 20	Jul 20	Aug 20	Aug 20	Feb 21	Jul 21	Feb 22	Jul 22			
7	Nov 20	Dez 20	Dez 20	Jan 21							
8	Jan 21	Feb 21	Feb 21	Mrz 21	Sep 21	Mrz 22					
9	Dez 20	Dez 20	Jan 21	Jan 21	Apr 21	Jun 21	Okt 21	Jan 22	Mrz 22		
10	Okt 21	Nov 21	Nov 21	Nov 21	Jul 22						
11	Jan 22	Feb 22	Mrz 22	Mrz 22							
12	Mrz 22	Mrz 22	Apr 22	Apr 22							
13	Apr 22	Mai 22	Mai 22	Jun 22							
14	Mai 22	Jun 22	Jun 22	Jul 22							
15	Jun 22	Jul 22	Jul 22								

Bei neun von 15 Pferden (60 %) finden sich Einträge zum Verlauf. Einmal wurde beschrieben, dass die Melanome laufend kleiner geworden sind (Pferd 3, 7 %), einmal wurde eine vollständige Remission beobachtet (Pferd 5, 7 %). Die Melanome von Pferd 8 sind zunächst kleiner geworden und dann unverändert geblieben (7 %). Bei sechs Pferden (40 %) haben sich die Melanome unverändert gezeigt, als sie zu einer erneuten Impfung vorgestellt wurden (Pferd 1, 4, 6, 7, 10, 13).

Zu Pferd 1 gibt es die meisten Einträge im TIS, dieses hat als erstes die Impfung erhalten und wurde mit insgesamt vier Jahren über den längsten Zeitraum geimpft. Zunächst haben die Melanome keine Veränderung in Folge der Impfungen gezeigt. Bei der letzten Auffrischungsimpfung im November 2020 (Tab. 4) wurde ein Wachstum und eine wiederholte Abszedierung der Melanome am After beobachtet.

Bei Pferd 4 wurde ein inspiratorischer Stridor vor der Impfung beschrieben, welcher mit dem Melanom in Zusammenhang stand.

Tab. 5: Anzahl der pro Pferd durchgeführten Impfungen

Pferd	Anzahl der Impfungen
1	4
2	8
3	8
4	4
5	8
6	4
7	6
8	9
9	5
10	4
11	4
12	4
13	4
14	4
15	3
arith. Mittelwert	5,7
Median	4

Pferd 9 wurde als einziges mit non-grey horse melanoma diagnostiziert, dies wurde auch histologisch bestätigt. Eine Aussage über die Malignität konnte allerdings nicht getroffen werden. Es wurde vermerkt, dass auf Wunsch der Besitzer:innen das Impfintervall auf 10 Wochen verkürzt wurde, da neue Melanome aufgetreten waren. Bei den darauf folgenden Impfterminen, wurde eine Regression, bzw. eine teilweise Remission beschrieben. Die Melanome waren laut Eintrag im TIS bei der letzten Impfung im März 2022 nicht mehr stärker pigmentiert als die Haut.

In einem Fall (Pferd 11, 7 %) ist eine Impfreaktion vermerkt, welche von den Besitzer:innen telefonisch gemeldet wurde. Die Injektionsstelle war laut diesen geringgradig geschwollen und heiß, ansonsten war das Pferd aber bei gutem Allgemeinbefinden und wies keine erhöhte innere Körpertemperatur auf. Bei den folgenden Impfungen gab es keine Einträge dieser Art.

3.2 Ergebnisse der Umfrage

Bei der Umfrage haben von den 15 kontaktierten Besitzer:innenn zehn teilgenommen, dies entspricht einer Rücklaufquote von 66,6 %.

3.2.1 Vorherige Therapie

Zwei Besitzer:innen (20 %) haben angegeben, dass vor der Impfung bereits eine Therapie der Melanome stattgefunden hat. Im Fall von Pferd 8 war dies eine chirurgische Exzision, Pferd 13 hat Cimetidin erhalten (Tab. 6). Bei den restlichen acht Pferden (80 %) wurde keine weitere Therapie durchgeführt.

3.2.2 Verlauf und Auftreten neuer Melanome

Bei der Frage nach dem Verlauf, haben sieben Besitzer:innen (70 %) angegeben, dass die Melanome nach der Impfung nicht weiter gewachsen sind (Abb. 2).

Tab. 6: Übersicht über die Umfrageantworten nach Pferden

Pferd	andere Therapie	Verlauf nach der Impfung	Auftreten an neuen Stellen	Impfreaktionen	Pferd noch im Besitz	Zufriedenheit ²	Bereitschaft weiter zu impfen
3	Nein	A ³	Nein	Nein	Ja	4	Ja
4	Nein	A ³	Nein	Nein	Nein ⁴	5	Ja
5	Nein	A ³	Nein	Nein	Ja	4	Ja
6	Nein	A ³	Nein	Nein	Ja	3	Ja
8	Ja ⁵	A ³	Nein	Nein	Ja	3	Ja
9	Nein	B ⁶	Ja	Nein	Ja	5	Ja
10	Nein	A ³	Ja	Nein	Ja	4	Ja
12	Nein	B ⁶	Nein	Nein	Ja	5	Ja
13	Ja ⁷	A ³	Nein	Nein	Ja	3	Ja
14	Nein	B ⁶	Nein	Nein	Ja	5	Ja

²5=sehr zufrieden 4=zufrieden 3=wenig zufrieden 2=wenig unzufrieden 1=unzufrieden 0=sehr unzufrieden

³A - Die Melanome sind nicht weiter gewachsen.

⁴Verkauft

⁵chirurgische Exzision

⁶B - Die Melanome sind kleiner geworden.

⁷Cimetidin-Gabe

Bei keinem Pferd (0 %) haben sich die Melanome vollständig zurückgebildet. Keiner der Besitzer:innen (0 %) hat angegeben, dass die Impfung keinen Effekt auf die Melanome hatte. Bei drei Pferden (30 %, Pferd 9, 12 und 14) sind die Melanome kleiner geworden.

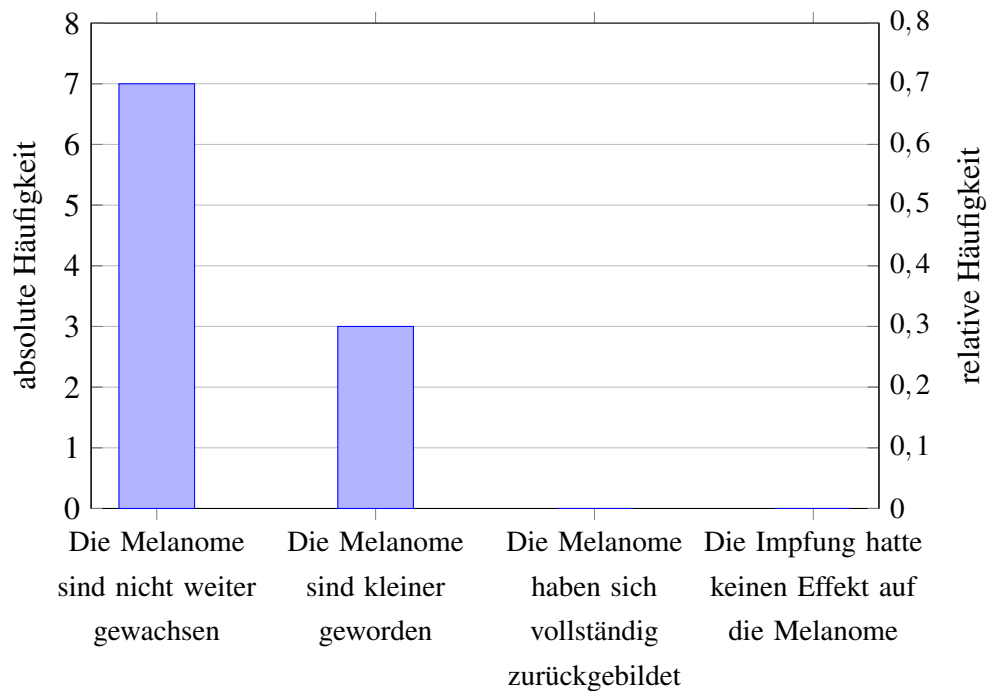


Abb. 2: Wie würden Sie den Verlauf nach der Impfung beschreiben?

Eine Verbesserung war bei Pferd 9 nach 42 Tagen nach der ersten Impfung erkennbar, bei Pferd 12 nach 92 Tagen und bei Pferd 14 nach 90 Tagen. Im Schnitt ist eine Verbesserung demnach, sofern eine eingetreten ist, nach 74,7 Tagen aufgefallen (Tab. 7).

Tab. 7: Zeitraum bis zum Auftreten einer Besserung

Pferd	Tage Gesamt
9	42
12	92
14	90
arith. Mittelwert	74,7

Außerdem hatten die Besitzer:innen die Möglichkeit per Freitext Anmerkungen zum Verlauf zu machen. Der Stridor von Pferd 4 der auch im TIS beschrieben wurde, ist laut Besitzer:in nach der Impfung nicht mehr aufgetreten. Bei Pferd 9, welches als einziges ein Schwarzbrauner ist, wurde 3 Wochen nach der Impfung kein schwarzes Sekret mehr von den Melanomen sezerniert. Nach 6 Wochen wurde beobachtet, dass die Melanome nicht mehr vermehrt pigmentiert sind. Dies stimmt mit dem Einträgen im TIS zu diesem Fall überein.

Das Melanom an der Ganasche von Pferd 13 ist nach Besitzer:innenaussage nicht weiter gewachsen und wirkt „weniger knotig“.

Pferd 9 und 10 (20 %) haben nach der Impfung an neuen Stellen Melanome entwickelt, bei den anderen acht Pferden (80 %) sind keine neuen hinzugekommen (Abb. 3).

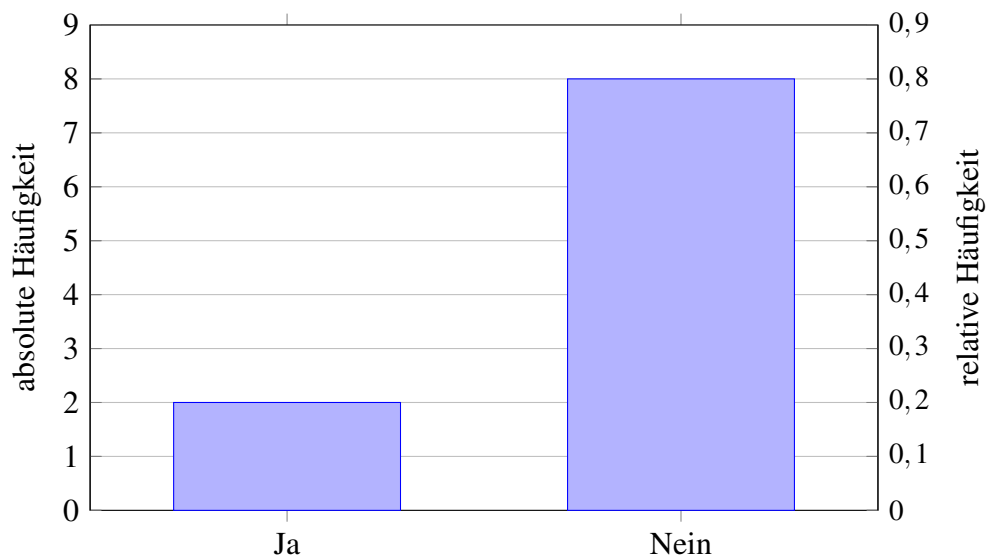


Abb. 3: Sind nach der Impfung an neuen Stellen Melanome aufgetreten?

3.2.3 Impfreaktionen

Alle zehn Besitzer:innen (100 %) haben angegeben, dass keine Reaktionen infolge der Impfung aufgetreten sind (Tab. 6).

3.2.4 Verbleib der Pferde

Neun der Pferde (90 %) haben sich zum Zeitpunkt der Umfrage noch im Besitz befunden. Ein Pferd (10 %) wurde verkauft. Kein Pferd (0 %) ist verstorben (Tab. 6).

3.2.5 Zufriedenheit der Besitzer:innen

Vier Besitzer:innen (40 %) haben angegeben, sehr zufrieden mit dem Preis-Leistungsverhältnis der Impfung zu sein. Jeweils drei Besitzer:innen (30 %) waren zufrieden oder eher zufrieden (Abb. 4).

Alle zehn Besitzer:innen (100 %) würden weiter impfen, wenn der Impfstoff noch verfügbar wäre (Abb. 5).

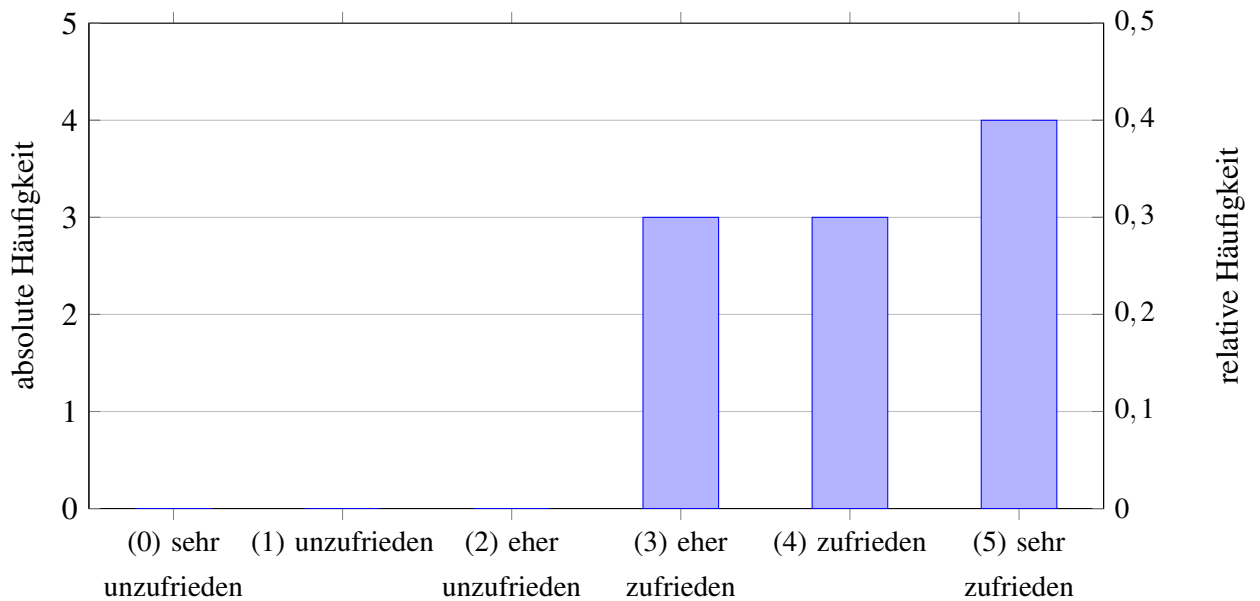


Abb. 4: Wie zufrieden sind Sie mit dem Preis-Leistungsverhältnis der Impfung?

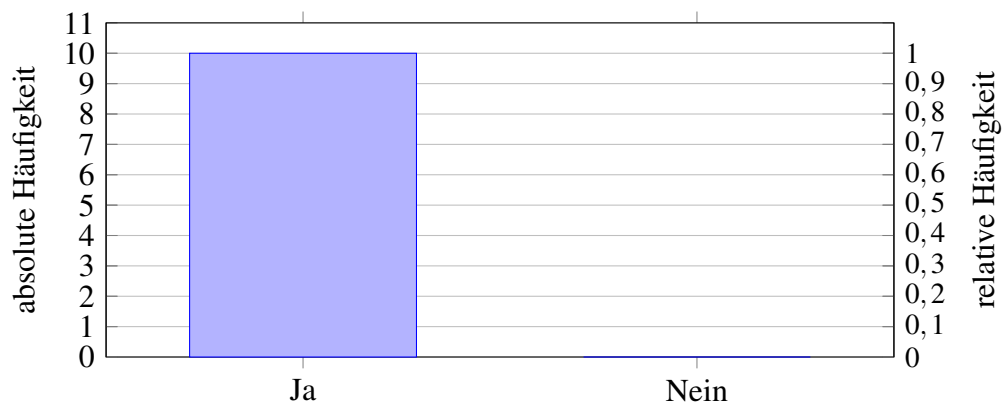


Abb. 5: Würden Sie Ihr Pferd weiter impfen, wenn der Impfstoff noch verfügbar wäre?

4 Diskussion

Melanome beim Pferd sind eine ernst zunehmende Erkrankung, da sie mit der Zeit durch infiltratives Wachstum und Metastasierung zu lokalen Komplikationen wie z. B. Einschränkungen beim Kot- und Harnabsatz oder der Futteraufnahme führen und schmerzhaft sein können. Je nach Lokalisation der Melanome kann außerdem die Nutzbarkeit als Reitpferd eingeschränkt sein. Aus diesen Gründen sollten sie behandelt werden, allerdings gibt es aktuell, wie früher beschrieben, keine zu 100 % verlässlich wirksame Therapie.

Mit der Immunotherapie beim EMM haben sich mehrere Autoren auseinander gesetzt und, dass der Einsatz der xenogenen DNA Vakzine Oncept® sinnvoll sein kann, wurde in Vorstudien belegt [38, 11]. Es wurde nachgewiesen, dass sowohl in equinen als auch caninen Melanomen Tyrosinase exprimiert wird, welche als Angriffspunkt für die Vakzine dient [11]. Außerdem wurde die Applikationstechnik mithilfe der nadelfreien Injektion evaluiert und als gut geeignet befunden [38]. Die Ausbildung einer humoralen und einer zellvermittelten Immunität bei tumorfreien Pferden nach der Impfung mit der Oncept® Vakzine, wurde ebenfalls belegt [12]. Erfolgsversprechende Ergebnisse nach dem off-label Einsatz konnten beobachtet werden [1], jedoch wurden bislang keine Ergebnisse klinischer Studien veröffentlicht, die die Wirksamkeit des Impfstoffs bei Pferden nachweisen.

Die Hypothese dieser Arbeit, dass die Impfung bei Pferden zu einer klinischen Verbesserung führt, wurde zum Teil bestätigt. Bei etwa einem Drittel der Patienten sind die Melanome kleiner geworden, bei den restlichen Pferden sind sie zumindest nicht weiter gewachsen. Auch die Verträglichkeit und die Zufriedenheit der Besitzer:innen waren gut.

4.1 Wirksamkeit

Im Rahmen der Umfrage stellte sich heraus, dass bei 70 % der Pferde die Melanome nach der Impfung nicht weiter gewachsen sind, bei 30 % sind die Melanome kleiner geworden. Bei einem Pferd berichteten die Besitzer:innen von einem positiven Effekt auf den Stridor der im Zusammenhang mit den Melanomen beobachtet wurde. Dieser ist nach der Impfung nicht mehr aufgetreten.

Zum Teil gibt es Abweichungen zwischen den Ergebnissen aus dem TIS und denen der Umfrage. Die bei Pferd 5 im TIS beschriebene vollständige Remission konnte durch die Umfrage nicht bestätigt werden, dort gaben die Besitzer:innen an, dass die Melanome nach der Impfung nicht weiter gewachsen seien. Auch bei Pferd 3 wird im TIS beschrieben, dass die Melanome langsam, aber laufend kleiner geworden seien. In der Umfrage gaben die Besitzer:innen jedoch an die Melanome seien nach der Impfung nicht weiter gewachsen. Dies erschwert die Beurtei-

lung der Wirksamkeit. Wie diese Abweichungen zustande kommen, lässt sich nur vermuten. Möglicherweise, liegt es daran, dass zwischen dem Telefonat in dem die Remission bei Pferd 3 beschrieben wurde und der Umfrage einige Monate vergangen sind.

Pferd 9 stellt einen Sonderfall dar, da es einerseits als einziges ein Brauner ist und andererseits das Impfintervall auf 12 Wochen verkürzt wurde. Dies geschah aufgrund des ausdrücklichen Wunsches der Besitzer:innen, da es zu einem Rezidiv gekommen war. Aus dem TIS geht hervor, dass die Melanome daraufhin nicht mehr vermehrt pigmentiert waren. Dies lässt auf einen Effekt der Impfung schließen und eine solche Anpassung des Impfschemas könnte auch bei anderen Patienten in Zukunft in Betracht gezogen werden.

Nimmt man die Ergebnisse der Umfrage und die Daten aus dem TIS zusammen, lässt sich der Verlauf für zwölf der 15 Pferde beschreiben. Zusammengefasst ist es in drei Fällen zu einer Verkleinerung der Melanome gekommen (25 %) und bei neun Pferden (75 %) sind sie unverändert geblieben. Nur bei 20 % der Pferde sind nach der Impfung neue Melanome aufgetreten.

Zur Beurteilung der Wirksamkeit von Tumorthérapien gibt es in der Humanmedizin die Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) und speziell zur Evaluierung der Immuntherapie die immunerelated Response Criteria (irRC) [36]. Die Einteilung erfolgt nach den RECIST in eine vollständige oder partielle Therapieantwort oder in eine stabile oder progressive Erkrankung. Berücksichtigt werden dabei die Größenveränderungen der Tumore, sowie die der betroffenen Lymphknoten und das Auftreten neuer Tumore [40]. Die irRC berücksichtigen die Besonderheiten der Immunotherapie. Bei dieser kann es verglichen mit zytotoxischen Therapien länger dauern, bis eine Verkleinerung der Tumore zu beobachten ist. Außerdem ist es möglich, dass es durch die Immunreaktion und die damit einhergehende Entzündung zunächst zu einem Wachstum der Tumore kommt und erst verzögert eine Verkleinerung auftritt. Außerdem wird nach den irRC, im Gegensatz zu den RECIST, eine Einstufung als stabile Erkrankung als Therapieerfolg [41] gewertet.

Berücksichtigt man dies bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit, lässt sich der Verlauf beim Großteil der Patienten als stabile Erkrankung einordnen, was wiederum als Therapieerfolg zu werten ist. Zusätzlich wurde bislang beim EMM keine spontane Tumorregression beobachtet [36], also ist davon auszugehen, dass jede beschriebene Verkleinerung auf die Wirkung der Impfung zurückzuführen ist.

In der Umfrage stellte sich raus, dass eine Verbesserung im Schnitt nach 74,7 Tagen sichtbar war. Dies entspricht der Aussage von Wolchok et al. [41], dass die Ergebnisse der Immuntherapie erst verzögert sichtbar werden, im Vergleich zu denen zytotoxischer Therapien.

Bei 80 % der Pferde sind keine neuen Melanome nach der Impfung aufgetreten.

Für zukünftige Studien wäre es sinnvoll, eine Kontrollgruppe zu haben und genaue Messungen der Tumorgroße durchzuführen. Da dies bei der vorliegenden Arbeit nicht der Fall war, muss sich bei den Ergebnissen auf die subjektiven Beobachtungen der Besitzer:innen verlassen werden. Ein Trend ist jedoch auch hier erkennbar.

4.2 Verträglichkeit

Bei den 15 Pferden die in dieser Arbeit untersucht wurden und 86 durchgeführten Impfungen insgesamt, ist nur in einem Fall eine lokale Reaktion mit Schwellung und Wärmeentwicklung im Bereich der Einstichstelle aufgetreten. Alle anderen Patienten haben die Impfung gut vertragen. Auch Pferd 9 welches in kürzeren Abständen die Auffrischungsimpfungen erhalten hat, zeigte keine Unverträglichkeit. Bei Phillips et al. [38] ist auch nur bei einem von elf Pferden eine lokale Reaktion mit Ödembildung 24 h nach der Injektion aufgetreten. Mählmann et al. [36] beschreibt bei allen Pferden eine lokale Schwellung, zusammen mit einer Erhöhung der inneren Körpertemperatur am Tag nach der Injektion. Bei 26 von 27 wurde außerdem eine Depigmentation der Haut im Bereich der Einstichstelle beschrieben. Allerdings wurde in dieser Studie ein anderer HuTyr exprimierender Impfstoff eingesetzt und in Kombination mit eqIL-18 und eqIL-12 verabreicht, weshalb sich diese Ergebnisse nicht 1:1 mit denen dieser Arbeit vergleichen lassen. Aber auch bei Mählmann et al. [36] sind keine schwerwiegenden systemischen Nebenwirkungen aufgetreten und die Autor:innen bezeichnen die Impfung als sicher und gut toleriert. Die Verträglichkeit war bei den in dieser Arbeit untersuchten Pferden somit ähnlich gut wie auch in anderen Studien.

Pferd 1 hat außerdem über einen Zeitraum von vier Jahren insgesamt elf Dosen erhalten, ohne dass Nebenwirkungen dokumentiert wurden. Dies zeigt, dass Oncept® auch über einen längeren Zeitraum sicher beim Pferd angewendet werden kann.

4.3 Zufriedenheit

Alle Besitzer:innen haben angegeben, zufrieden mit dem Preis-Leistungsverhältnis der Impfung gewesen zu sein. Drei der vier Besitzer:innen, die „sehr zufrieden“ ausgewählt haben, haben auch angegeben, dass die Melanome kleiner geworden seien. Die Bereitschaft der Besitzer:innen ihr Pferd weiter impfen zu lassen lag bei 100 %. Diese Ergebnisse zeigen eine hohe Zufriedenheit der Besitzer. Bei den hohen Kosten, die durch die wiederholten Impfungen entstehen, ist davon auszugehen, dass die Impfung in den Augen der Besitzer:innen einen Nutzen für ihr Tier bringt. Einschränkend ist zu sagen, dass die Pferde auf freiwilliger Basis der Besitzer:innen die Impfung erhalten haben, weshalb anzunehmen ist, dass diese von vornherein der Impfung gegenüber positiv eingestellt waren. Außerdem handelt es sich bei den Pferden um

Patienten für die eine andere Therapieform nicht in Frage kommt, weil z. B. eine chirurgische Exzision aufgrund der Lokalisation nicht möglich ist. In dem Fall stellt die Impfung die einzige Therapieoption dar, was auch die hohe Bereitschaft der Besitzer:innen ihre Pferde weiter impfen zu lassen, erklärt.

4.4 Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen der bisher veröffentlichten Studien übereinstimmen. Die Oncept[®] Impfung ist sicher im Einsatz, ihre Wirksamkeit lässt sich jedoch nicht zufriedenstellend belegen, da bislang zu wenig Daten vorhanden sind. Um eine genauere Aussage treffen zu können, müssten größer angelegte Studien mit mehr Patienten und einer Kontrollgruppe durchgeführt werden. Außerdem fehlen Daten zur Anwendung über einen längeren Zeitraum. Interessant wäre es auch die, Wirkung der Impfung auf die Melanome unter Berücksichtigung ihrer Lokalisation zu untersuchen.

Der Einsatz der Vakzine zur Behandlung von Melanomen, unabhängig von der Tierart, ist unter Veterinärönkologen kontrovers [42]. Oncept[®] ist zwar von der USDA für Hunde zugelassen, diese verlangt aber nur den Nachweis der Sicherheit und eine annehmbare erwartete Wirkung. Randomisierte und placebo-kontrollierte klinische Studien wurden auch beim Hund bisher nicht durchgeführt [42]. Die Impfung kann aber laut Pellin [42] eine gute Möglichkeit sein, wenn die Besitzer:innen aufgeklärt sind über die Studienlage und die finanziellen Ressourcen haben, ihr Tier impfen zu lassen. Dies spiegelt sich auch in der durchweg positiven Bewertung des Preis-Leistungsverhältnisses der Impfung durch die Besitzer und die hohe Bereitschaft mit der Therapie fortzufahren (100 %) wieder.

4.5 Ausblick

In Zukunft könnte die Immunotherapie alleine oder in Kombination mit konventionellen Methoden erfolgreich zur Therapie des EMMs eingesetzt werden [8]. Ihre systemische Wirkung bietet einen Vorteil bei chirurgisch nicht oder nur schwer zugänglichen Tumoren und bei einer großen Anzahl an Tumoren. Laut Cavalleri et al. [39] stellt die Oncept[®] Vakzine die bislang erfolgreichste Immuntherapie für Pferde mit malignen Melanomen dar. Weitere Forschung mit größer angelegten Studien und einer Kontrollgruppe sind noch nötig um die Wirksamkeit belegen zu können. Auch andere immunotheapeutische Ansätze sollten untersucht werden.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Klinische Einteilung des EMM nach Moore et al. [5]	2
Tab. 2:	Darstellung der Therapiemöglichkeiten bei EMM nach Pimenta, Prada und Cotovio [8]	7
Tab. 3:	Nationale der Patienten	16
Tab. 4:	Übersicht über die pro Pferd durchgeführten Impfungen	17
Tab. 5:	Anzahl der pro Pferd durchgeführten Impfungen	18
Tab. 6:	Übersicht über die Umfrageantworten nach Pferden	19
Tab. 7:	Zeitraum bis zum Auftreten einer Besserung	20

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Aufbau der Umfrage ¹	14
Abb. 2:	Wie würden Sie den Verlauf nach der Impfung beschreiben?	20
Abb. 3:	Sind nach der Impfung an neuen Stellen Melanome aufgetreten?	21
Abb. 4:	Wie zufrieden sind Sie mit dem Preis-Leistungsverhältnis der Impfung? . . .	22
Abb. 5:	Würden Sie Ihr Pferd weiter impfen, wenn der Impfstoff noch verfügbar wäre?	22

Literatur

- [1] Phillips JC und Lembcke LM. Equine melanocytic tumors. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2013; 29(3):673–87
- [2] Mcfadyean J. Equine melanomatosis. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 1933; 46:186–IN8. DOI: 10.1016/S0368-1742(33)80025-7
- [3] Seltenhammer MH, Simhofer H, Scherzer S, Zechner R, Curik I, Sölkner J et al. Equine melanoma in a population of 296 grey Lipizzaner horses. *Equine Vet J* 2003; 35(2):153–7. DOI: 10.2746/042516403776114234
- [4] Foley GL, Valentine BA und Kincaid AL. Congenital and acquired melanocytomas (benign melanomas) in eighteen young horses. *Vet Pathol* 1991; 28(5):363–9. DOI: 10.1177/030098589102800503
- [5] Moore JS, Shaw C, Shaw E, Buechner-Maxwell V, Scarratt WK, Crisman M et al. Melanoma in horses: Current perspectives. *Equine Vet Educ* 2013; 25(3):144–51. DOI: 10.1111/j.2042-3292.2011.00368.x
- [6] Johnson PJ. Dermatologic tumors (excluding sarcoids). *Vet Clin North Am Equine Pract* 1998; 14(3):625–58, viii. DOI: 10.1016/s0749-0739(17)30190-6
- [7] Valentine BA. Equine melanocytic tumors: a retrospective study of 53 horses (1988 to 1991). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1995; 9(5):291–7. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1995.tb01087.x
- [8] Pimenta J, Prada J und Cotovio M. Equine Melanocytic Tumors: A Narrative Review. *Animals* 2023; 13(2):247. DOI: 10.3390/ani13020247
- [9] Smith SH, Goldschmidt MH und McManus PM. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol* 2002; 39(6):651–78. DOI: 10.1354/vp.39-6-651
- [10] Körner A und Pawelek J. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science (New York, N.Y.)* 1982; 217(4565):1163–5. DOI: 10.1126/science.6810464
- [11] Phillips JC, Lembcke LM, Noltenius CE, Newman SJ, Blackford JT, Grosenbaugh DA et al. Evaluation of tyrosinase expression in canine and equine melanocytic tumors. *Am J Vet Res* 2012; 73(2):272–8. DOI: 10.2460/ajvr.73.2.272
- [12] Lembcke LM, Kania SA, Blackford JT, Trent DJ, Odoi A, Grosenbaugh DA et al. Development of Immunologic Assays to Measure Response in Horses Vaccinated with Xenogeneic Plasmid DNA Encoding Human Tyrosinase. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012; 32(10):607–15. DOI: 10.1016/j.jevs.2012.02.011

- [13] Rosengren Pielberg G, Golovko A, Sundström E, Curik I, Lennartsson J, Seltenhammer MH et al. A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nat Genet* 2008; 40(8):1004–9. DOI: 10.1038/ng.185
- [14] MacKay RJ. Treatment Options for Melanoma of Gray Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2019; 35(2):311–25. DOI: 10.1016/j.cveq.2019.04.003
- [15] Cavalleri JMV, Mählmann K, Steinig P und Feige K. Aetiology, clinical presentation and current treatment options of equine malignant melanoma – a review of the literature. *PHK* 2014; 30(4):455–60. DOI: 10.21836/PEM20140410
- [16] Lindgren G, Naboulsi R, Frey R und Solé M. Genetics of Skin Disease in Horses. *Vet Clin North Am Equ* 2020; 36:323–39. DOI: 10.1016/j.cveq.2020.03.010
- [17] Campagne C, Julé S, Bernex F, Estrada M, Aubin-Houzelstein G, Panthier JJ et al. RACK1, a clue to the diagnosis of cutaneous melanomas in horses. *BMC Vet Res* 2012; 8(1):95. DOI: 10.1186/1746-6148-8-95
- [18] Ramos-Vara JA und Frank C. B. and DuSold DMMA. Immunohistochemical expression of melanocytic antigen PNL2, Melan A, S100, and PGP 9.5 in equine melanocytic neoplasms. *Vet Pathol* 2014; 51(1):161–6. DOI: 10.1177/0300985812471545
- [19] Conrado FO, Iapoce N, Batista-Linhares M, Lopez S, Matthews MH, McKinney CA et al. Circulating melanin-containing cells and neutrophils with phagocytized melanin granules in a horse with disseminated melanoma. *Veterinary Clinical Pathology* 2020; 49(4):624–31. DOI: 10.1111/vcp.12914
- [20] Knottenbelt DC, Patterson-Kane JC und Snalune KL. Clinical equine oncology. Edinburgh: Elsevier, 2015 :237–46
- [21] R. C. Pilsworth, D. Knottenbelt. Melanoma. *Equine Vet Educ.* 2006 :228–30
- [22] Rowe EL und Sullins KE. Excision as treatment of dermal melanomatosis in horses: 11 cases (1994-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2004; 225(1):94–6. DOI: 10.2460/javma.2004.225.94
- [23] Groom LM und Sullins KE. Surgical excision of large melanocytic tumours in grey horses: 38 cases (2001-2013). *Equine Vet Educ* 2018; 30(8):438–43. DOI: 10.1111/eve.12767
- [24] Metcalfe LV, O’Brien PJ, Papakonstantinou S, Cahalan SD, McAllister H und Duggan VE. Malignant melanoma in a grey horse: case presentation and review of equine melanoma treatment options. *Ir Vet J* 2013; 66(1):22. DOI: 10.1186/2046-0481-66-22

-
- [25] Sullins KE. Melanocytic tumours in horses. *Equine Vet Educ* 2020; 32(12):624–30. DOI: 10.1111/eve.13159
 - [26] Hewes CA und Sullins KE. Use of cisplatin-containing biodegradable beads for treatment of cutaneous neoplasia in equidae: 59 cases (2000-2004). *J Am Vet Med Assoc* 2006; 229(10):1617–22. DOI: 10.2460/javma.229.10.1617
 - [27] Théon AP, Wilson WD, Magdesian KG, Pusterla N, Snyder JR und Galuppo LD. Long-term outcome associated with intratumoral chemotherapy with cisplatin for cutaneous tumors in equidae: 573 cases (1995-2004). *J Am Vet Med Assoc*. 2007; 230(10):1506–13
 - [28] Spugnini EP, Alterio GL d', Dotsinsky I, Mudrov T, Dragonetti E, Murace R et al. Electrochemotherapy for the Treatment of Multiple Melanomas in a Horse. *Journal of Equine Veterinary Science* 2011; 31(8):430–3. DOI: 10.1016/j.jevs.2011.01.009
 - [29] Byron C, DeWitt M, Latouche E, Davalos R und Robertson J. Treatment of Infiltrative Superficial Tumors in Awake Standing Horses Using Novel High-Frequency Pulsed Electrical Fields. *Frontiers in veterinary science* 2019; 6:265. DOI: 10.3389/fvets.2019.00265
 - [30] Goetz TE, Ogilvie GK, Keegan KG und Johnson PJ. Cimetidine for treatment of melanomas in three horses. *J Am Vet Med Assoc* 1990; 196(3):449–52
 - [31] Laus F, Cerquetella M, Paggi E, Ippedico G, Argentieri M, Castellano G et al. Evaluation of cimetidine as a therapy for dermal melanomatosis in grey horse. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 2010
 - [32] Helle N. Effectiveness of cimetidine on the size of melanomas of 40 grey horses. *Dissertation*. 2012
 - [33] Weber LA. In vitro and in vivo development of a topical drug for the treatment of equine skin cancer - based on naturally occurring and synthetically modified substances in plane bark. 1st ed. Göttingen: Cuvillier Verlag, 2021
 - [34] Weber LA, Delarocque J, Feige K, Kietzmann M, Kalbitz J, Meißner J et al. Effects of Topically Applied Betulinic Acid and NVX-207 on Melanocytic Tumors in 18 Horses. *Animals: an open access journal from MDPI*. Bd. 11(11). 2021. DOI: 10.3390/ani11113250. eprint: 34827981
 - [35] Müller JMV, Feige K, Wunderlin P, Hödl A, Meli ML, Seltenhammer M et al. Double-blind placebo-controlled study with interleukin-18 and interleukin-12-encoding plasmid DNA shows antitumor effect in metastatic melanoma in gray horses. *J Immunother* 2011; 34(1):58–64. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181fe1997

- [36] Mählmann K, Feige K, Juhls C, Endmann A, Schuberth HJ, Oswald D et al. Local and systemic effect of transfection-reagent formulated DNA vectors on equine melanoma. *BMC Vet Res* 2015; 11(1):1–11. DOI: 10.1186/s12917-015-0422-9
- [37] McLean JL und Lobetti RG. Use of the melanoma vaccine in 38 dogs: The South African experience. *J S Afr Vet Assoc* 2015; 86(1):1246. DOI: 10.4102/jsava.v86i1.1246
- [38] Phillips JC, Blackford JT, Lembcke LM, Grosenbaugh DA und Leard T. Evaluation of Needle-free Injection Devices for Intramuscular Vaccination in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 2011; 31(12):738–43. DOI: 10.1016/j.jevs.2011.06.012
- [39] Cavalleri JMV, Mählmann K, Schuberth HJ und Feige K. Prospect for immunological therapies of the equine malignant melanoma. *PHK* 2015; 31(5):448–60. DOI: 10.21836/PEM20150504
- [40] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2009; 45(2):228–47. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.10.026
- [41] Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009; 15(23):7412–20. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1624
- [42] Pellin MA. The Use of Oncept Melanoma Vaccine in Veterinary Patients: A Review of the Literature. *Veterinary Sciences* 2022; 9(11):597. DOI: 10.3390/vetsci9110597

Anhang A - Fragebogen

Umfrage zur Schimmelmelanom-Impfung

In dieser Umfrage sind 16 Fragen enthalten.

Name

Name des Pferdes *

Bitte geben Sie Ihre Antwort hier ein:

weitere Therapie

Hat vor der Impfung schon einmal eine Therapie der Melanome (z. B eine Operation) stattgefunden? *

❗ Bitte kreuzen Sie eine der folgenden Antworten an:

Bitte wählen Sie nur eine der folgenden Antworten aus:

- ☐ Ja
☐ Nein

Welche?

*

Beantworten Sie diese Frage nur, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

Antwort war 'Ja' bei Frage '[q2]' (Hat vor der Impfung schon einmal eine Therapie der Melanome (z. B eine Operation) stattgefunden?)

Bitte geben Sie Ihre Antwort hier ein:

Verlauf

Wie würden Sie den Verlauf nach der Impfung beschreiben?

*

❗ Bitte kreuzen Sie eine der folgenden Antworten an:

Bitte wählen Sie nur eine der folgenden Antworten aus:

- ☐ Die Melanome sind nicht weiter gewachsen.
☐ Die Melanome sind kleiner geworden.
☐ Die Melanome haben sich vollständig zurückgebildet.
☐ Die Impfung hatte keinen Effekt auf die Melanome. *(sie sind genauso schnell gewachsen wie vor der Impfung)*

Anhang A - Fragebogen

In welchem zeitlichen Abstand zur ersten Impfung ist eine Besserung aufgetreten? *

Beantworten Sie diese Frage nur, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

Antwort war 'Die Melanome haben sich vollständig zurückgebildet.' oder 'Die Melanome sind kleiner geworden.' bei Frage ' [q4]' (Wie würden Sie den Verlauf nach der Impfung beschreiben?)

❗ Nur Zahlen dürfen in diese Felder eingegeben werden.

Bitte geben Sie Ihre Antwort(en) hier ein:

Tage

Wochen

Monate

bei nicht zutreffendem bitte eine 0 eintragen

Anmerkungen zum Verlauf

Bitte geben Sie Ihre Antwort hier ein:

weitere Melanome

Sind nach der Impfung an neuen Stellen Melanome aufgetreten? *

❗ Bitte kreuzen Sie eine der folgenden Antworten an:

Bitte wählen Sie nur eine der folgenden Antworten aus:

☐ Ja

☐ Nein

Impfreaktionen

Sind nach der Injektion Impfreaktionen aufgetreten? *

❗ Bitte kreuzen Sie eine der folgenden Antworten an:

Bitte wählen Sie nur eine der folgenden Antworten aus:

☐ Ja

☐ Nein

Anhang A - Fragebogen

Welche Impfreaktionen sind aufgetreten? *

Beantworten Sie diese Frage nur, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

Antwort war 'Ja' bei Frage '[q8]' (Sind nach der Injektion Impfreaktionen aufgetreten?)

❗ Bitte kreuzen Sie alles an, was stimmt.

Bitte wählen Sie alle zutreffenden Antworten aus:

☐ Lokale Reaktion an der Injektionsstelle (Schmerzen, Schwellung)

☐ Fieber

☐ Mattigkeit

☐ Sonstiges:

Besitz

Befindet sich das Pferd aktuell noch in Ihrem Besitz? *

❗ Bitte kreuzen Sie eine der folgenden Antworten an:

Bitte wählen Sie nur eine der folgenden Antworten aus:

☐ Ja

☐ Nein

Seit wann nicht mehr? *

Beantworten Sie diese Frage nur, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

Antwort war 'Nein' bei Frage '[q10]' (Befindet sich das Pferd aktuell noch in Ihrem Besitz?)

Bitte ein Datum eingeben:

Warum befindet es sich nicht mehr in Ihrem Besitz? *

Beantworten Sie diese Frage nur, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

Antwort war 'Nein' bei Frage '[q10]' (Befindet sich das Pferd aktuell noch in Ihrem Besitz?)

❗ Bitte kreuzen Sie eine der folgenden Antworten an:

Bitte wählen Sie nur eine der folgenden Antworten aus:

☐ Verkauf

☐ Tod

Anhang A - Fragebogen

Ist es im Zusammenhang mit den Melanomen verstorben? *

Beantworten Sie diese Frage nur, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

Antwort war 'Tod' bei Frage ' [q12]' (Warum befindet es sich nicht mehr in Ihrem Besitz?)

❶ Bitte kreuzen Sie eine der folgenden Antworten an:

Bitte wählen Sie nur eine der folgenden Antworten aus:

- ☐ Ja
☐ Nein

Zufriedenheit

Wie zufrieden sind Sie mit dem Preis-Leistungsverhältnis der Impfung? *

Bitte wählen Sie die zutreffende Antwort für jeden Punkt aus:

	0 (sehr unzufrieden)	1	2	3	4	5 (sehr zufrieden)
Zufriedenheit	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Würden Sie ihr Pferd weiter impfen, wenn der Impfstoff noch verfügbar wäre?

*

❶ Bitte kreuzen Sie eine der folgenden Antworten an:

Bitte wählen Sie nur eine der folgenden Antworten aus:

- ☐ Ja
☐ Nein

Mitteilungen

Möchten Sie uns außerdem etwas mitteilen?

Bitte geben Sie Ihre Antwort hier ein:

28.02.2023 – 11:10

Übermittlung Ihres ausgefüllten Fragebogens:

Vielen Dank für die Beantwortung des Fragebogens.