

Aus der Neurochirurgischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Hans-Jakob Steiger

**Experimentelle Untersuchungen zur lokoregionalen Eröffnung
der Blut-Hirn-Schranke im Rattenmodell durch
den Neodyn-YAG Laser an der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Marion Gorol

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan
Referent: Priv.-Doz. Dr. Sabel
Korreferent: Prof. Dr. Bilzer

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	5
1.1 INZIDENZ UND PROGNOSE MALIGNER GLIOME.....	5
1.2 THERAPIE DER GLIOME	7
1.2.1 CHIRURGISCHE RESEKTION	7
1.2.2 POSTOPERATIVE BESTRAHLUNG	7
1.2.3 CHEMOTHERAPIE	8
1.3 ANATOMIE UND PHARMAKOLOGIE DER BLUT-HIRN-SCHRANKE	9
1.4 DIE BLUT-HIRN-SCHRANKE IN MALIGNEN HIRNTUMOREN	11
1.5 THERAPEUTISCHE ERÖFFNUNG DER BLUT-HIRN-SCHRANKE	11
1.6 DIE LASER-INDUZIERTER INTERSTITIELLE THERMOTHERAPIE (LITT) ALS METHODE DER LOKOREGIONALER ERÖFFNUNG DER BLUT-HIRN-SCHRANKE.....	13
1.7 AUFGABENSTELLUNG.....	13
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 LASERSYSTEM.....	15
2.2 VERSUCHSTIERE.....	17
2.3 VERSUCHSAUFBAU	18
2.4 FÄRBETECHNIKEN	18
2.4.1 MAKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER AKUTEN BLUT-HIRN- SCHRANKENSTÖRUNG DURCH DAS EVANS-BLUE MODELL	18
2.4.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	19
2.4.3 HERSTELLUNG DER PRÄPARATE.....	19
2.4.4 ENTPARAFFINIERUNG DER SCHNITTE.....	20
2.4.5 DURCHFÜHRUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE	20
2.4.5.1 PEROXIDASE- ANTIPEROXIDASE TECHNIK (PAP)	20
2.4.5.2 INDIREKTE AVIDIN-BIOTIN PEROXIDASE METHODE (ABC).....	22

2.5	UNTERSUCHUNGEN ZUM INTRAZEREBRALEN EINDRINGEN VON PACLITAXEL NACH LASERBESTRAHLUNG MITTELS HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)	23
3.	ERGEBNISSE	25
3.1	NACHWEIS DER AKUTEN BLUT-HIRN-SCHRANKENSTÖRUNG.....	25
3.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE ERGEBNISSE	28
3.3	ERGEBNISSE DER HPLC	30
3.3.1	STATISTISCHE ANALYSE DER HPLC-ERGEBNISSE.....	30
4.	DISKUSSION	33
5.	ZUSAMMENFASSUNG	41
6.	LITERATURVERZEICHNIS	42
7.	ABKÜRZUNGEN	53
8.	DANKSAGUNG	54
9.	CURRICULUM VITAE	55

1. EINLEITUNG

1.1 INZIDENZ UND PROGNOSE MALIGNER GLIOME

Die Inzidenz bösartiger Tumoren der Glia, der sogenannten malignen Gliome (anaplastische Gliome WHO Grad III und Glioblastome WHO Grad IV) beträgt in den westlichen Industrienationen etwa 6/100.000 Einwohner pro Jahr. Damit liegt der Anteil der malignen Gliome an allen Krebsarten bei aktuell ca. zwei Prozent, wobei die Häufigkeit dieser Tumoren zunimmt (Lantos et al. 1996; Salzman et al. 1985). Der häufigste und bösartigste hirneigene Tumor ist das Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV), das mit einer mittleren Überlebenszeit von weniger als einem Jahr trotz maximaler Therapie zu den bösartigsten Tumoren des Menschen überhaupt gehört. Anaplastische Astrozytome, anaplastische Oligodendrogliome und anaplastische Oligoastrozytome (WHO Grad III) unterscheiden sich bezüglich der längeren Überlebenszeit vom Glioblastoma multiforme, sind jedoch ebenfalls unheilbare Tumoren. Grundlage der Standardtherapie der malignen Gliome ist die möglichst radikale Tumorresektion mit anschließender Bestrahlung. Durch eine optimierte interdisziplinäre Therapie hat sich zwar eine verbesserte Zytoreduktion, aber keine wesentliche Verlängerung der Überlebenszeit ergeben (Albert et al. 1994; Kiwit et al. 1996). Aggressives Vorgehen mit Tumorresektion im Gesunden und hochdosierter Radiatio führt zu keiner signifikanten Verbesserung der Lebenserwartung, ist aber mit einer zum Teil erheblichen Einschränkung der Lebensqualität, Morbidität und sogar Mortalität verbunden.

Diese besonders schlechte Prognose erklärt sich im wesentlichen durch die Fähigkeiten der Gliomzellen zur aktiven Migration und Invasion (Burger et al. 1988), die zu einer diffusen Infiltration des umliegenden funktionellen Hirngewebes, aber auch von wesentlich weiter entfernten Hirnregionen führt (Abb.1)

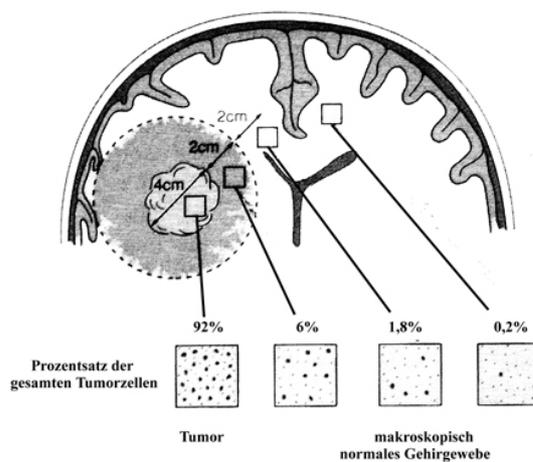


Abb.1: Darstellung der Infiltration des umliegenden Hirngewebes durch Tumorzellen maligner Gliome. Beachte, daß 8% der Tumorzellen in makroskopisch unauffälligem Hirngewebe vorliegen. Abb. modifiziert nach Enam et al. 1998.

Hierbei dient häufig das Corpus callosum als Wegstrecke zur Ausbreitung auf die kontralaterale Hemisphäre, was dann das typische Bild des sogenannten "Schmetterlingsgliomes" ergibt. Als weitere Ausbreitungswege werden häufig die Capsula interna, Commissura anterior, die Radiatio optica oder perivaskuläre Räume benutzt. Dahingegen beobachtet man eine Infiltration der Gefäßlumina oder des Subarachnoidalraumes sehr selten.

Die umgebende Infiltrationszone des Tumors, die neuroradiologisch dem perifokalen Ödem entspricht und intraoperativ als ödematös veränderte weiße Substanz erscheint, muß insbesondere in eloquenten Hirnregionen zur Verhinderung zusätzlicher postoperativer Defizite geschont werden, da sie aus noch funktionellem Nervengewebe besteht. Aus diesem Grunde ist in der Hirntumorchirurgie eine Resektion oder eine postoperative Bestrahlung ohne Sicherheitssaum zum Gesunden als kritisch zu betrachten, da sonst die Gefahr besteht, daß postoperativ zusätzlich neurologische Defizite auftreten.

Folglich sind die malignen Gliome zwar lokale Tumoren, können aber in der Regel aufgrund ihres infiltrativen Wachstums nicht in toto operativ entfernt werden. Eine systemische Therapie der Gliome, wie sie zum Beispiel für Leukämien, Lymphome und Keimzelltumoren mittels Chemotherapie erfolgreich durchgeführt wird, existiert bisher nicht. Hieraus ergibt sich das Interesse an der Etablierung neuer therapeutischer Strategien.

1.2. THERAPIE DER GLIOME

1.2.1 CHIRURGISCHE RESEKTION

Primärbestandteil der Therapie ist die neurochirurgische Resektion (Fransen et al. 1993). Dabei wird eine möglichst vollständige Entfernung des Tumors angestrebt.

Eine komplette Resektion, abhängig von der Lokalisation, ist nur bei nicht infiltrativ wachsenden Gliomen des WHO Grades I wie dem pilozytischen Astrozytom möglich. Die kurative Resektion von diffusen Gliomen (WHO Grad II, III und IV) ist wie bereits oben erwähnt in der Regel nicht möglich. Durch alleinige Operation ohne adjuvante Radio- und Chemotherapie werden beim Glioblastom mediane Überlebenszeiten von nur 3-4 Monaten nach Diagnosestellung erreicht. Die Komplikationsrate variiert je nach Operationszentrum und wird, bezüglich der Resektion von supratentoriellen Gliomen, in einer Studie mit einer Morbidität von 32% und einer Mortalität von 3% angegeben (Fadul et al. 1988).

1.2.2 POSTOPERATIVE BESTRAHLUNG

Eine konventionelle externe Herd- oder Ganzschädelbestrahlung wird nach dem Prinzip der möglichst selektiven Tumorzellschädigung angewendet. Bestrahlt werden alle Tumoren der WHO-Grade III und IV.

Nebenwirkungen der Strahlentherapie umfassen akute Strahlenreaktionen mit Kopfschmerz, Müdigkeit, Übelkeit, Alopezie und Epithelschäden. Eine späte Strahlenreaktion birgt das Risiko der Leukoencephalopathie, der Verschlechterung des neurologischen Zustandes, der Strahlennekrose, des Katarakts, der Myelopathie und der Induktion von Zweittumoren (Leibel et al. 1991). Des weiteren stehen je nach Indikation die Anwendung der Radiochirurgie, die Pion (pimeon)-Bestrahlung (Pickles et al. 1997) und die sogenannte Bor-Neutroneneinfang Methode. Letztere befindet sich noch im

experimentellen Stadium. Dabei soll der Kern eines Boratoms sog. epithermische Neutronen, also Neutronen einer spez. Energie, aufnehmen und anschließend durch Aussendung einer kurzstreckigen Strahlung zerfallen (Schlegel, Westphal 1998). In einer Phase I- Studie wurde 2003 die Bor Konzentration während dieser Therapie bei 5 Patienten mittels gamma-ray Teleskop untersucht (Verbakel WF et al. 2003). Die Gruppe bestimmte erhöhte Konzentrationen in Bereichen des operierten Tumors während das gesunde Gehirngewebe keine erhöhten Konzentrationen aufwies.

1.2.3 CHEMOTHERAPIE

Die Behandlung maligner Gliome mit Nitrosoharnstoffen [Carmustine, Lomustine, Semustine, Nimustine, und 1(2-chloroethyl)-3-(2,6-dioxo-1-piperidyl)-1-Nitrosoharnstoff (PCNU)] hat sich als Standard in der adjuvanten Behandlung maligner Gliome etabliert (Levin et al. 1980; Levin et al. 1981). Allerdings wurde keine wesentliche Verlängerung der mittleren Überlebenszeit bei Patienten mit Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) und anaplastischen Astrozytomen durch eine zusätzlich zur Resektion und Strahlentherapie durchgeführte Therapie mit Nitrosoharnstoffen erreicht. Interessant ist jedoch eine deutliche Steigerung individueller Überlebenszeiten, was ein individuelles Ansprechen auf die Nitrosoharnstofftherapie impliziert (Walker et al. 1980). Versuche mit intra-arterieller Applikation von Nitrosoharnstoffen wurden durch die hohe ZNS-Toxizität der Substanzen kompliziert und wurden verlassen (Roosen et al. 1989; Greenberg et al. 1981).

Procarbazin, Vincristin, Cis-platinum, Carboplatin und Etoposide wiesen jeweils in Phase II Studien eine noch geringere Effizienz als Nitrosoharnstoffe auf (Green et al. 1983; Evans et al. 1990; Rosenstock et al. 1976; Mahaley, Jr. et al. 1989; Newton et al. 1989; Poisson et al. 1991; Warnick et al. 1994; Tirelli et al. 1984).

Diese schlechten Ergebnisse der Monotherapien führten zur Einführung von polychemotherapeutischen Behandlungsschemata.

Die Einführung der Kombinationschemotherapie mit Procarbazine, Lomustine

und Vincristine (PCV) führte zu mäßigen, allerdings im Vergleich überlegenen Ergebnissen bei der Behandlung der Patienten mit Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) und anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III). Im Gegensatz zu Glioblastomen und astrozytär differenzierteren Tumoren sprechen jedoch circa zwei Drittel der anaplastischen Oligodendrogliome (WHO Grad III) und anaplastischen Oligoastrozytome (WHO Grad III) auf diese Therapie an (Peterson et al. 1996; Cairncross, 1994; Cairncross et al. 1994)

Obwohl die ernüchternden Ergebnisse der Chemotherapie speziell bei astrozytären Tumoren seit langem bekannt sind, ist über die zugrundeliegende Ursache der Resistenz dieser Tumoren gegenüber den derzeit verfügbaren Chemotherapeutika bisher wenig bekannt.

Die Problematik läßt sich in einen extrinsischen und einen intrinsischen Problembereich unterteilen:

Extrinsisch: das Vorhandensein der Bluthirnschranke (BHS) als wesentliches Hemmnis einer gleichmäßigen und ausreichenden Verteilung der Chemotherapeutika im Tumor.

Intrinsisch: zellgebundene Resistenzmechanismen, die mit einer primären oder sekundären Chemotherapieresistenz der Tumorzellen assoziiert sind.

1.3 ANATOMIE UND PHARMAKOLOGIE DER BLUT-HIRN-SCHRANKE

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine membranöse Barriere, die eine freie Diffusion zwischen dem interstitiellen Kompartiment des Gehirns und dem intravaskulären Kompartiment verhindert. Anatomisch besteht die BHS aus zwei hintereinander geschalteten Plasma-Membranen, einer luminalen und einer antiluminalen Membran des Endotheliums. Diese werden durch ein 0.3 Micron breites endotheliales Zytosol getrennt. Die Kapillarendothelien im Gehirn und Rückenmark von Wirbeltieren weisen tight junctions auf, die wie ein Reißverschluß wirken und die in extrazerebralen Gefäßen normalerweise bestehenden interendothelialen Poren schließen (Brightman et al. 1970). Diese endothelialen tight junctions bestehen aus sechs bis acht Verbindungsbändern (Brightman, 1977) und bilden eine enge Verbindung mit den angrenzenden

Endothelzellen. Der elektrische Widerstand über dieser Membran ist sehr hoch und vergleichbar mit anderen dicht abschließenden Membranen wie dem Epithel der Harnblase (Bradburg, 1984). Elektrisch geladene Moleküle (wasserlösliche Substanzen oder geladene Proteinkomplexe) können somit nicht passiv die BHS durchqueren. Andererseits bewirken diese anatomischen Eigenschaften, daß lipophile Substanzen (z.B. Alkohol und Narkotika) passiv durch die zerebralen Kapillarmembranen passieren können. Viele lipophile Substanzen sind jedoch an Plasmaproteine gebunden: für diese Substanzen ist die Überschreitung der BHS von der Dissoziation des Proteinkomplexes abhängig (Cornford, 1985), da größere Proteine die BHS nicht überschreiten.

Die physiologische BHS schränkt somit die Penetranz der Chemotherapeutika in das Interstitium des ZNS hochgradig ein:

- Wasserlösliche Chemotherapeutika und proteingebundene, lipophile Chemotherapeutika können die BHS nicht penetrieren.
- Lediglich nicht-proteingebundene, lipophile Chemotherapeutika können die BHS frei überschreiten.

Hierbei handelt es sich im wesentlichen um die Gruppe der Nitrosoharnstoffe (ACNU, BCNU, CCNU) und das erst seit kurzer Zeit zur Verfügung stehende Temozolomide (Temodal™).

Chemotherapeutika, welche die BHS ubiquitär überschreiten und damit in das gesamte ZNS penetrieren, weisen jedoch einen gravierenden Nachteil auf: Sie sind durch ihre massive Neurotoxizität problematisch, die zu wesentlich schwerwiegenderen Nebenwirkungen führen kann als die myelo- oder gastrointestinale Toxizität der peripher wirkenden Zytostatika. Neurotoxizität führt nicht nur zu massiven Einbußen in der Lebensqualität, sondern bedeutet aufgrund der geringen Regenerationsfähigkeit des neuralen Gewebes häufig ein permanentes Defizit.

1.4 DIE BLUT-HIRN-SCHRANKE IN MALIGNEN HIRNTUMOREN

Ein wesentliches Argument, das für die systemische Chemotherapie glialer Tumoren spricht, ist die pathologische Veränderung der BHS im Bereich der hirneigenen malignen Tumoren.

Die Kapillaren in malignen Gliomen weisen gestörte interendotheliale Verbindungen, endotheliale Perforationen und andere für neoplastische Vaskulatur charakteristische ultrastrukturelle Abnormalitäten auf (Hirano et al. 1969). Hierdurch werden die pathologischen Kapillaren der malignen Gliome für die meisten Chemotherapeutika durchlässig, die sich dann per Diffusion im Tumor verteilen. Da aber nicht alle Tumorkapillaren gleichermaßen "lecken", ist die Verteilung hoch-molekularer Therapeutika im Tumorbett ungleichmäßig. Zudem ist die BHS in der Infiltrationszone des Tumors nicht gestört (Levin et al. 1975), so daß diese für die Rezidivbildung verantwortliche Zone durch nicht BHS gängige Chemotherapeutika nicht erreicht wird.

1.5 THERAPEUTISCHE ERÖFFNUNG DER BLUT-HIRN-SCHRANKE

Aus den oben genannten Überlegungen resultiert die Bestrebung, die BHS zu therapeutischen Zwecken zu eröffnen.

Zahlreiche Studien haben bestätigt, daß die BHS die adäquate Anflutung von Zytostatika in den Tumor und das Umgebungsgewebe limitiert (Fenstermacher, Cowles, 1977; Groothuis et al. 1982; Neuwelt et al. 1982). Um die Anflutung von Zytostatika in das Gehirnparenchym zu erhöhen, wurden zunächst intrakarotidale Infusionen von Mannit angewandt (Neuwelt et al. 1984; Stewart, Wiley, 1981). Obwohl die hyperosmolaren Infusionen die Zytostatikaanflutung durch die BHS deutlich erhöhten, weist dieser Therapieansatz gravierende Nachteile auf (Millay et al. 1986; Tomiwa et al. 1983). Das effektive Areal der Zytostatikaanflutung ist auf das Versorgungsgebiet der injizierten Arterie limitiert. Zudem führt die Ausschaltung der BHS zu einer Anflutung von neurotoxischen Substanzen in

das nicht-neoplastische Gehirngewebe. Die resultierende Schädigung kann zu massiven neurologischen Komplikationen führen. Außerdem führt diese Therapie nur zu einer 25-prozentigen Permeabilitätserhöhung innerhalb des eigentlichen Tumorgewebes.

Die Gruppe von Pardridge, Kumagai und Eisenberg (Kumagai et al. 1987; Pardridge et al. 1987) versuchte durch eine Bindung von Zytostatika an Moleküle, die mit Hilfe spezieller Transportsysteme durch die BHS transportiert werden, eine interstitielle Anreicherung der Zytostatika zu erreichen. Auch diese Technik ist aufgrund der Anreicherung potentiell toxischer Substanzen im normalen Hirngewebe problematisch, da keine Unterscheidung zwischen pathologischem und physiologischem Gewebe erfolgt.

Ein weiterer Ansatz zur Eröffnung der BHS und insbesondere der Blut-Tumor-Schranke basiert auf der Beobachtung, daß die Permeabilität normaler Gehirnkapillaren durch bestimmte vasoaktive Substanzen nicht erhöht wird. Im Gegensatz hierzu scheint bei Tumorgefäßen oder geschädigten Kapillaren durch vasoaktive Substanzen, wie z.B. Leukotrienen und Bradykininen, eine erhöhte Permeabilität induzierbar zu sein. Hierdurch könnten intrakarotidale Infusionen von z.B. Leukotrienen, Bradykinin oder Bradykinin-Analogen selektiv die Kapillarpermeabilität innerhalb eines Hirntumors erhöhen, ohne die Kapillarpermeabilität in normalen Gehirngewebe zu beeinflussen (Black et al. 1990). Ein sehr vielversprechender Ansatz erschien sich hierbei durch RMP-7, ein Bradykinin-Analog, zu ergeben. RMP-7 wurde bereits in Phase I Studien erprobt (Ford et al. 1998; Cloughesy et al. 1997). Diese Phase I Studien zeigten keinen wesentlichen Effekt auf die Überlebenszeit, ergaben jedoch Hinweise auf Toxizität im nicht-neoplastischen Gewebe. Dies entspricht der Annahme, daß Bradykinin und seine Analoga die Blut-Tumor-Schranke relativ stärker eröffnen als die Blut-Hirn-Schranke, die physiologische BHS somit ebenfalls eröffnet wird (Cloughesy et al. 1997). Ein weiterer Nachteil der Methode ist, ähnlich wie für Mannit dargestellt, der durch die intra-arterielle Applikation auf das jeweilige Versorgungsgebiet der Arterien beschränkte Effekt.

1.6 DIE LASER-INDUZIERTER INTERSTITIELLE THERMOTHERAPIE (LITT) ALS METHODE DER LOKOREGIONALER ERÖFFNUNG DER BLUT-HIRN-SCHRANKE

Eine ideale Methode zur Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke sollte die Eröffnung der BHS auf den Bereich von Tumor und Infiltrationszone limitieren und damit einerseits das Einströmen von Chemotherapeutika erlauben, andererseits die schützende BHS jedoch soweit intakt lassen, daß Nebenwirkungen der anflutenden Chemotherapeutika auf gesundes Hirngewebe minimiert werden. Die meisten nicht lipophilen Chemotherapeutika weisen eine hohe Plasmaeiweißbindung insbesondere an Albumin auf (de Vita et al. 1999). Idealerweise müßte somit eine lokoregionale Eröffnung der BHS auf den Tumor und die umgebende Infiltrationszone beschränkt sein und eine Einflutung von Serumalbumin oder anderen Serumproteinen ermöglichen.

Kiessling konnten zeigen, daß eine fokale Bestrahlung des Rattenhirns mit einem Nd-YAG Laser zu einer lokoregionalen Eröffnung der BHS führt, die den Ausstrom von Plasmaproteinen in das umliegende Hirngewebe ermöglicht (Kiessling et al. 1990). Erste neurochirurgische Applikationen des Lasers fokussierten jedoch auf die ablativ Wirkung des Nd-YAG Lasers bei offenen Operationen (Sakaki et al. 1991). Mit der Einführung der laser-induzierten interstitiellen Thermotherapie (LITT) durch Bettag wurde eine stereotaktische, minimal invasive Methode entwickelt (Bettag et al. 1991), welche die Applikation von interstitieller Nd-YAG Laserenergie unter direkter Magnet Resonanz Tomographie (MRT) -Kontrolle ermöglichte (Kahn et al. 1994). Leonardi favorisierte bei selektierten Patienten diese minimalinvasive Technik gegenüber der offenen Reoperation bei Rezidivgliomen (Leonardi MA et al. 2002).

Bereits in ersten tierexperimentellen Arbeiten zur LITT ergaben sich an der Ratte Hinweise auf eine lokoregionale Störung der BHS, die zu Ausstrom von Serumalbumin in das umliegende Gewebe führte (Schober et al. 1993; Sabel 1994). Genauere Daten zur Quantität und Qualität der Eröffnung der BHS wurden in diesen Arbeiten jedoch nicht erhoben. Diese Untersuchungen sind deshalb von besonderem Interesse, weil die Methode der LITT neben einer

lokoregionalen Ablation von Tumorgewebe durch Koagulation bei einer geeigneten Eröffnung der BHS auch die Möglichkeit einer lokoregional begrenzten Chemotherapie bieten könnte.

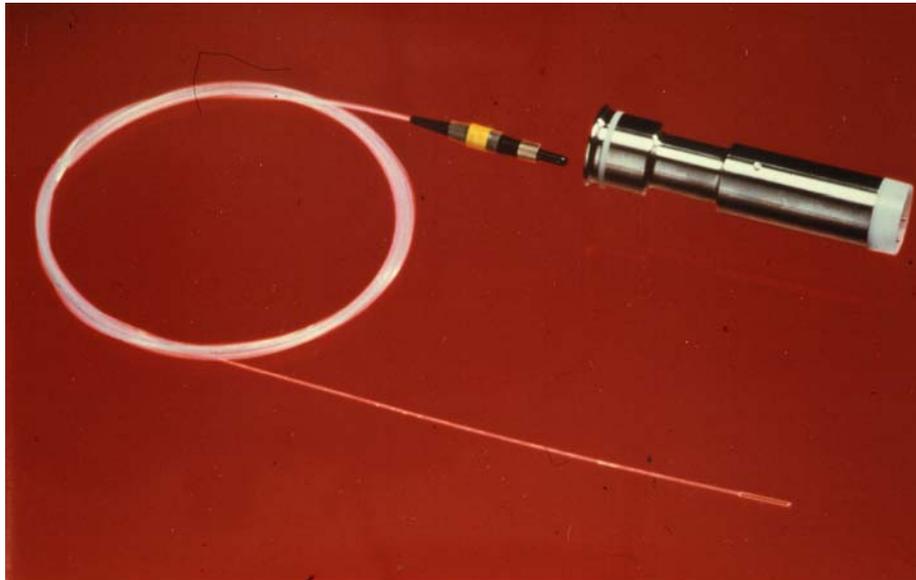
1.7 AUFGABENSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte die lokoregionale Eröffnung der BHS durch den Nd-YAG Laser unter dem Aspekt einer potentiell therapeutisch zu nutzenden Eröffnung der BHS für Chemotherapeutika im Tierexperiment untersucht werden. In einem ersten Versuchsansatz wurde der Zeitverlauf der akuten BHS-Öffnung für Serumalbumin eingegrenzt. Eine weitere Charakterisierung der BHS-Störung erfolgte durch die immunhistochemische Untersuchung verschiedener Serumproteine mit unterschiedlichem Molekulargewichten im Zeitverlauf. In einem dritten Versuchsansatz wurde überprüft, ob eine LITT-Behandlung des Rattengehirns ein Eindringen eines unter physiologischen Bedingungen nicht in das Gehirngewebe penetrierenden Chemotherapeutikums ermöglicht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 LASERSYSTEM

Für unsere Untersuchungen wurden ein handelsüblicher cw (continuous wave = Dauerstrich) 1,06 μm Nd-YAG Laser (Medilas 4060N, Dornier Medizintechnik, Germering) und ein spezielles Faserübertragungssystem, der ITT (Interstitielle Thermotherapie)-Lichtleiter (Dornier Medizintechnik, Germering) verwendet (Abb. 2).



**Abb. 2: LITT-Lichtleiter mit Steckeradapter
für den Nd-YAG Laser
Medilas 4060N, Dornier Medizintechnik, Germering**

Das Laserlicht wurde hierbei über einen Steckeradapter ("Ringmodeadapter") so in die Quarzfaser des Lichtleiters eingekoppelt, daß es am distalen Ende in Form eines Kegelmantels austrat und eine relativ homogene Streuung des Laserlichtes im Gewebe bewirkte (Abb. 3).

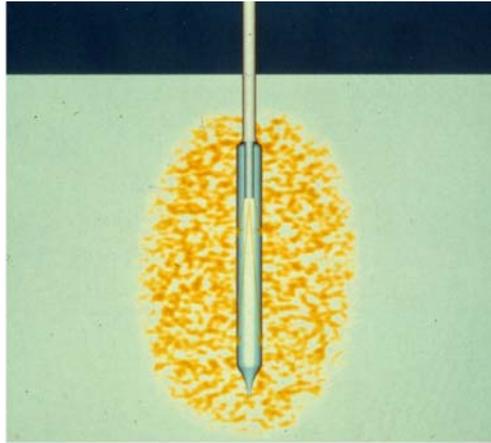


Abb. 3: Spitze des ITT- Lichtleiters mit charakteristischer Streuung des Laserlichtes aus der Zylinderfläche der Lichtleiterspitze

Hierdurch wurde die Leistungsdichte an der Faserspitze reduziert, was die Applikation höherer Laserleistungen ermöglichte. Der Lichtleiter hatte einen Faserkerndurchmesser von $600\ \mu\text{m}$ und einen Faseraußendurchmesser von $1,0\ \text{mm}$. Die Faserlänge betrug $200\ \text{cm}$. Der Durchmesser der Lichtleiterspitze betrug $1,1\ \text{mm}$, die Länge der Spitze $7\ \text{mm}$. Der Lichtleiter war flexibel und metallfrei. Eine zusätzliche Kühlung der Quarzfaser war nicht erforderlich, da die Quarz-Glasfaserkappe eine Gewebehaftung weitgehend ausschloß.

Die Ausgangsleistung des Nd-YAG Lasers wurde während der Bestrahlung über ein integriertes Leistungsmeßgerät kontrolliert.

Vor und nach jeder Bestrahlung wurde das gesamte System mit einem separaten Leistungsmeßgerät (MBB-AT powermeter LMG universal) kalibriert und der Transmissionsverlust über die Faser gemessen. Dieser betrug zwischen 10 und 17% der Ausgangsleistung.

2.2 VERSUCHSTIERE

Sämtliche nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden in der Zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Leitung Fr. Dr. med. vet. A. Treiber) durchgeführt. Der Regierungspräsident Düsseldorf erteilte dem Projekt unter der Nummer 66 / 97 eine Genehmigung zur Durchführung der Versuche nach dem Tierschutzgesetz. Die Untersuchungsreihen an normalen Rattengehirnen wurden an ausgewachsenen männlichen CD-Fischer-Ratten (Körpergewicht 180-230 g) einer identischen Population durchgeführt. Insgesamt wurden 60 Versuchstiere behandelt, von denen 51 Tiere in die Studiauswertung aufgenommen werden konnten. 6 Tiere verstarben vor dem geplanten Versuchsende, bei 3 Tieren kam es vor vollständiger Applikation des Chemotherapeutikums bzw. der Evans-Blue Lösung zu einer Dislokation des Katheters. Bei insgesamt 20 Kontrolltieren wurde der Lichtleiter implantiert, ohne daß eine Laserbestrahlung durchgeführt wurde, bei 2 Tieren wurde lediglich eine Perfusion mit Paclitaxel durchgeführt. Nicht am Tag der Bestrahlung aus dem Versuch genommene Tiere wurden für einen Zeitraum von 3 Stunden beobachtet und dann in ihre Käfige unter freiem Zugang zu Wasser und Futter gesetzt.

Die Tiere wurden in Edelstahldrahtkäfigen mit einer maximalen Belegung von fünf Tieren pro Käfig gehalten. Damit lag die maximale Auslastung bei $1\text{g}/\text{cm}^2$. Dem Käfig war grobes und entstaubtes Weichholzgranulat eingestreut, die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 55%, die Außentemperatur bei 22°C . Von 7-19 Uhr war Kunstlicht eingeschaltet, seine Stärke betrug in der Mitte des Raumes 100 cm über dem Boden 300 Lux. Das Futter bestand aus einer pelletierten Alleindiät, Altromin 1314 ad libitum. Die umsetzbare Energie dieser Diät betrug 13600 KJ/ kg, die Nährstoffe waren zu 47,5% aus N-freien Extraktstoffen und zu 23% aus Rohprotein zusammengesetzt, alle essentiellen Mineralstoffe, Vitamine, Spurenelemente wurden zugesetzt.

2.3 VERSUCHSAUFBAU

Anlage des Bohrloches und Durchführung der Laserbestrahlung:

Nach medianer Hautinzision (Allgemeinnarkose mit intramuskulärer Injektion von 0.17 ml HypnormTM und 0.07 ml ValiumTM pro 100 g Körpergewicht, Lokalanästhesie der Kopfhaut mit 1 % Lidocain) wurde das Periost bis zur linken Lateralseite abgeschoben und ein 1,5 mm großes Bohrloch über der Koronarnaht angelegt.

Die Versuchstiere wurden in einem speziell für Kleintiere entwickelten stereotaktischen Kopfraumen gelagert (David Kopf Instruments, Tujunga, Californien, USA). Die Insertion des Laserlichtleiters erfolgte stereotaktisch geführt, so daß der kegelförmige Lichtaustritt in den Basalganglien lag. Die stereotaktischen Koordinaten wurden folgendermaßen eingestellt: +0° Seitenwinkel, 0° Höhenwinkel, 7 mm Tiefenanschlag (berechnet von der Tabula externa des Schädels). Anschließend wurde die Laserbestrahlung mit den Parametern 3Watt / 30sec durchgeführt.

2.4 FÄRBETECHNIKEN

2.4.1 MAKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER AKUTEN BLUT-HIRN-SCHRANKENSTÖRUNG DURCH DAS EVANS-BLUE MODELL

Intravenös appliziertes Evans-Blue bindet vollständig an Serumalbumin. Hierdurch entsteht ein blaugefärbter Marker mit einem Molekulargewicht (MG) von 66,3 KD, der die intakte BHS nicht überschreitet. Eine Öffnung der BHS für Serumalbumin unmittelbar nach der Applikation des Farbstoffes wird somit durch Blaufärbung des entsprechenden Gehirnareals nachgewiesen. (Übersicht bei Kroll, Neuwelt, 1998). Um den Zeitverlauf der BHS-Eröffnung für Albumin nach Lasertherapie zu verfolgen, erhielten jeweils 3 Ratten 30 min, 1h 30 min, 2h 30 min und 24h nach Laserapplikation (Parameter 3 Watt / 30sec) eine 5-minütige Perfusion von 2% Evans-Blue-Lösung über die V. femoralis. Bei jeweils 2 Kontrolltieren pro Zeitpunkt wurde vor Perfusion

lediglich der Lichtleiter eingeführt. Hierzu wurde ein Polyethylen-Schlauch (PE50) mittels mikrochirurgischer Technik in die rechte V. femoralis eingeführt. Es erfolgte die Perfusion von 2 ml/kg/KG der 2% Evans-Blue Lösung über 10 min. Bei einem, nicht in die Auswertung aufgenommenen, Tier kam es zu einer Dislokation des Katheters. Alle mit Evans-Blue perfundierten Tiere wiesen eine massive Blaufärbung der Subcutis und der Retina ca. 5 min nach Beginn der Perfusion auf. 1 Stunde nach Abschluß der Perfusion wurden die Tiere in tiefer Allgemeinnarkose dekapitiert, das Gehirn entnommen, in der Koronarebene parallel zum Läsionskanal aufgeschnitten und photodokumentiert.

2.4.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Durch den immunhistochemischen Nachweis von Serumproteinen im Gehirngewebe der behandelten Ratten sollte das Ausmaß der induzierten Schrankenstörung weiter eingegrenzt werden. Hierzu wurden Serumproteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten analysiert. Untersucht wurde die Expression von C3C (MG 185 KD), Fibrinogen (MG 340 KD) und IgM (MG 971 KD). Bei jeweils 3 Tieren wurde 30 min, 2h 30min, 24h und 48h nach Laserbestrahlung in tiefer Allgemeinnarkose eine Thorakotomie durchgeführt. Nach Durchtrennung der Vv. jugulares bds. erfolgte eine linksventrikuläre Perfusion mit 100ml 0.9% NaCL Lösung gefolgt von 100 ml Bouinscher Lösung (15 Teile Pikrinsäure, 5 Teile 40% Formalin, 1 Teil Essigsäure). Zwei zusätzlichen Tieren wurde pro Zeitpunkt anstelle der Laserbestrahlung lediglich der Lichtleiter in das Gehirn der Ratte eingeführt.

2.4.3 HERSTELLUNG DER PRÄPARATE:

Die entnommenen Gehirne wurden in Bouinscher Lösung 24 h nachfixiert. Anschließend wurden die Gehirne in Höhe des Stichkanals geteilt und mit der zu schneidenden Seite nach unten in die Einbettkapsel gelegt. Über Nacht erfolgte die Paraffineinbettung des Gewebes im Autotechnikon (Shandon Citadel 1000). Mittels aufsteigender Alkoholreihe (3 Std. 70%, 2 Std. 90%, 2 Std. 100%), Xylol (3 Std.) und Paraffin (2 Std.) wurden die Präparate entwässert und

schließlich in Paraplast eingebettet.

Zum Schneiden der Blöcke erfolgte eine Vorkühlung auf 4°C. Mit einem Schlittenmikrotom (Leitz) wurden Schnitte von 4-5 µm erstellt. Die einzelnen Schnitte wurden mittels Wasserbad gestreckt und danach auf Super Frost Plus Objektträgern (Menzel-Gläser) aufgezogen. Die Trocknung der fertigen Präparate erfolgte in einem Wärmeschrank über Nacht bei 40°C.

2.4.4 ENTPARAFFINIERUNG DER SCHNITTE:

Vor den immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnitte entparaffiniert. Zuerst wurden die Schnitte für 15 min in Xylol überführt, dann für 5 min. in einer 100%igen Alkohollösung wonach die Schnitte an der Luft getrocknet wurden. Eine Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte 30 min. in einer 1%igen H₂O₂-Methanol-Mischung. Über eine absteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte rehydriert und anschließend in Aqua dest. und PBS gespült.

2.4.5 DURCHFÜHRUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE

In der vorliegenden Arbeit wurde abhängig von der Spezifikation der Antikörper die Technik der indirekten Immunhistochemie angewendet.

2.4.5.1 PEROXYDASE- ANTIPEROXIDASE- TECHNIK (PAP):

Die Peroxydase-Antiperoxydase- Technik wurde für den Nachweis von Fibrinogen und C₃C- Komplement benutzt.

Dabei erfolgte der Nachweis von Fibrinogen durch das polyklonale Antiserum A 0080 (Dako, Glostrup, Dänemark), zum Nachweis von C₃C- Komplement wurde das polyklonale Antiserum A 0062 (Dako, Glostrup, Dänemark) eingesetzt. Die mit C₃C bearbeiteten Präparate wurden mit Pronase (10µg auf 10ml) vorbehandelt.

DURCHFÜHRUNG DER PAP- TECHNIK:

1. Präinkubation mit Schweinenormalserum 1:100 verdünnt in 5% PBSA (5%

bovines Serumalbumin in PBS) für 30 min bei Raumtemperatur (RT) zur Reduzierung unspezifischer Bindungen (200µl /Schnitt); Abheben des Serums

2. Beschichten der Schnitte mit dem prim. Antikörper über Nacht bei RT
Anti-Fibrinogen 1:50, Anti C₃C 1:100 in PBSA verdünnt (200µl /Schnitt)
3. Spülen der Schnitte mit PBS
4. Beschichtung mit dem Brückenantikörper Swine – anti- Rabbit 1:50
(Vector, Burlingham, USA) verdünnt in PBSA für 30 min bei RT (200µl /Schnitt)
5. Spülen der Schnitte mit PBS
6. 30 min Inkubation (200µl /Schnitt) mit dem Rabbit PAP- Komplex (Dako)
1:200 verdünnt in PBSA bei RT
7. Auftragen von 5mg 3,3'-Diaminbenzidine (DAB) der Fi. Sigma (D-5637)
gelöst in 10 ml PBSA, vermischt mit 3µl des Starters H₂O₂ 30% für 10 min
abgedeckt bei RT
8. Spülen mit Aqua dest.
9. Gegenfärben mit Hämalaun für 3 sec
10. mehrmaliges Spülen mit Leitungswasser
11. Dehydrierung der Präparate in aufsteigender Alkohollösung
12. Eindeckeln in Eukitt

2.4.5.2 INDIREKTE AVIDIN- BIOTIN- PEROXIDASE (ABC) METHODE:

Zum Nachweis von Anti- IgM wurde die ABC- Methode angewandt. Dabei wurde das polyklonale Antiserum AAR 08 (Serotec Ltd, Oxford, England) eingesetzt.

DURCHFÜHRUNG DER ABC- TECHNIK:

1. 30 min Präinkubation mit Rabbit Normalserum 1:100 verdünnt in PBSA bei RT (200µl /Schnitt)
2. Beschichten der Schnitte mit dem Primärantikörper über Nacht bei RT
Anti-IgM 1:500 in Pbsa verdünnt (200µl /Schnitt); es wurde das polyklonale Antiserum AAR 08 (Serotec Ltd, Oxford, England) benutzt
3. Sülung der Schnitte mit PBS
4. Beschichtung mit dem sekundären Antikörper biotinylierter Ziege- anti- Schaf Immunglobulinserum (Vector, Burlingham, USA) 1:100 verdünnt mit PBSA für 30 min bei RT (200µl/Schnitt)
5. Spülen mit PBS
6. 30 min Inkubation mit dem ABC- Komplex (Vector) bei RT (200µl/Schnitt)
1:50 verdünnt mit PBSA
7. – 12. Identisch mit Färbeanleitung für PAP-Technik

2.5 UNTERSUCHUNGEN ZUM INTRAZEREBRALEN EINDRINGEN VON PACLITAXEL NACH LASERBESTRAHLUNG MITTELS HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Um den direkten Nachweis des Übertrittes eines unter physiologischen Bedingungen die BHS nicht überschreitenden Chemotherapeutikums in das Rattengehirn zu erbringen, wurde ein direkter Nachweis der Konzentration von Paclitaxel (Taxol™) im Hirngewebe mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) durchgeführt. Insgesamt wurden 15 Tiere behandelt, von denen 11 ausgewertet werden konnten. Vor der Laserbestrahlung (wie oben beschrieben, 3W/30sec) wurde bei den Tieren ein Polyethylenschlauch (PE50) mittels mikrochirurgischer Technik in die rechte V. femoralis eingeführt. Unmittelbar nach Laserbestrahlung wurden die Tiere mit Paclitaxel (Konzentration 10 mg/kg KG, Verdünnung nach Maßgaben des Herstellers) mittels Perfusomaten (Braun, Modell Secura FT™) über 60 min. perfundiert. Bei 4 Kontrolltieren wurde vor Perfusion der Lichtleiter nur eingeführt; die Tiere wurden nicht bestrahlt. Bei 2 weiteren Kontrolltieren blieb das Gehirn unbehandelt, die Ratten wurden allerdings mit Paclitaxel perfundiert wie oben beschrieben.

11 Ratten (5 bestrahlte Tiere, 6 Kontrollen) wurden 2h 30min nach Laserbestrahlung und 1h 30min nach Abschluß der Perfusion in tiefer Allgemeinnarkose thorakotomiert. Nach Durchtrennung der Vv. jugulares bds. und Entnahme von ca. 2 ml Blut erfolgte eine linksventrikuläre Perfusion mit 150 ml 0.9% NaCl Lösung, um eine Kontamination des Gehirns mit intravasal verbliebenen Paclitaxel auszuschließen. Das entnommene Gehirn wurde sofort in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -70°C bis zur HPLC Analyse gelagert. Das Blut wurde 10min bei 5000 U/min zentrifugiert, das Serum abgehoben und bis zur HPLC Analyse bei -70°C gelagert. Zwei weitere Tieren wurden 1h 30 min nach Abschluß der Perfusion in tiefer Allgemeinnarkose thorakotomiert. Anschließend erfolgte das Prozedere wie oben beschrieben.

„REVERSED-PHASE“- CHROMATOGRAPHIE MIT HYPERSIL ODS-SÄULE

Nach Auftauen der Gehirne wurde das Gewebematerial in 5ml 0.9% NaCl homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 3000 U/min zentrifugiert. 1ml Überstand wurde entnommen und die Festphasenextraktion durchgeführt. Das an die Säule gebundene Paclitaxel wurde anschließend in 1ml Acetonitril (ACN) gelöst. Nach Verdampfung dieser Probe wurde der Rückstand in 400 µl Eluent (25% ACN in H₂O + 3 mmol/l Na-Acetat) gelöst. Nach Injektion in die Hypersil ODS-Säule erfolgte die Auftrennung mit einer Flußrate von 1ml/min. Die Quantifizierung erfolgte mittels UV- Detektor bei einer Wellenlänge von 260 Nanometer.

3. ERGEBNISSE

3.1 NACHWEIS DER AKUTEN BLUT-HIRN-SCHRANKENSTÖRUNG

30 min nach Laserbestrahlung konnte kein intrazerebraler Austritt von Evans-Blue beobachtet werden. Hier war lediglich der Defekt durch den eingebrachten Lichtleiter im Cortex und Nucl. Caudatum zu erkennen (Abb. 5, zur anatomischen Orientierung s. Abb. 4).

1h 30 min nach Laserbestrahlung konnte eine diskrete Blaufärbung im Bereich des Laserdefektes beobachtet werden. Die Anfärbung zog sich vom Cortex, dem unilateralen Corpus Callosum bis zum caudalen Anteil des Nucl.Caudatus.

2h 30min p.l. kam es bei allen bestrahlten Tieren zu einem ausgeprägten Austritt von Evans-Blue, der sich über den Balken bis in die kontralaterale Hemisphäre ausbreitete (Abb.5). In der coronaren Schnittführung wurde ein intrazerebraler Austritt von Evans- Blue vom Cortex ausgehend bis in den Globus Pallidus sichtbar. Kontralateral erkannte man eine Anfärbung des Corpus Callosum und im Bereich der Fimbrien.

24h nach Laserapplikation zeigte sich ein diskreter Austritt des Evans-Blue-Albumin-Komplexes, der ipsilateral beschränkt blieb und keine Beteiligung des kontralateralen Corpus Callosum aufwies (Abb. 5). Es zeigte sich eine ovalförmige Anfärbung entlang des Stichkanals, die lokal begrenzt blieb.

Die Kontrolltiere dieser Versuchsreihe, bei denen der Lichtleiter nur eingeführt wurde, zeigten unabhängig von dem Zeitraum zwischen Einführen des Lichtleiters und Perfusion mit Evans-Blue keine makroskopisch sichtbare Anfärbung (Abb. 5).

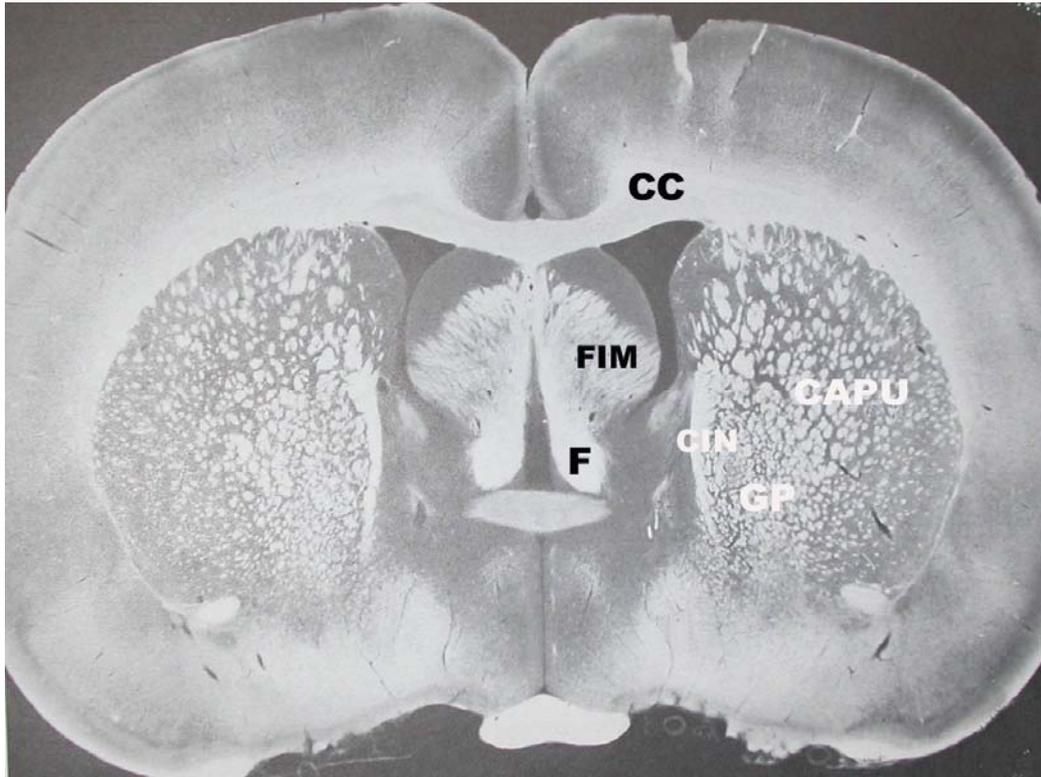


Abb. 4: Coronarschnitt eines Rattengehirns

CC- Corpus callosum, FIM- Fimbrien, F- Fornix, CIN- Capsula interna,

GP- Globus pallidus, CAPU- Nucl. Caudatus, Putamen

aus R. Thompson "Behavioral atlas of the rat brain", 1978

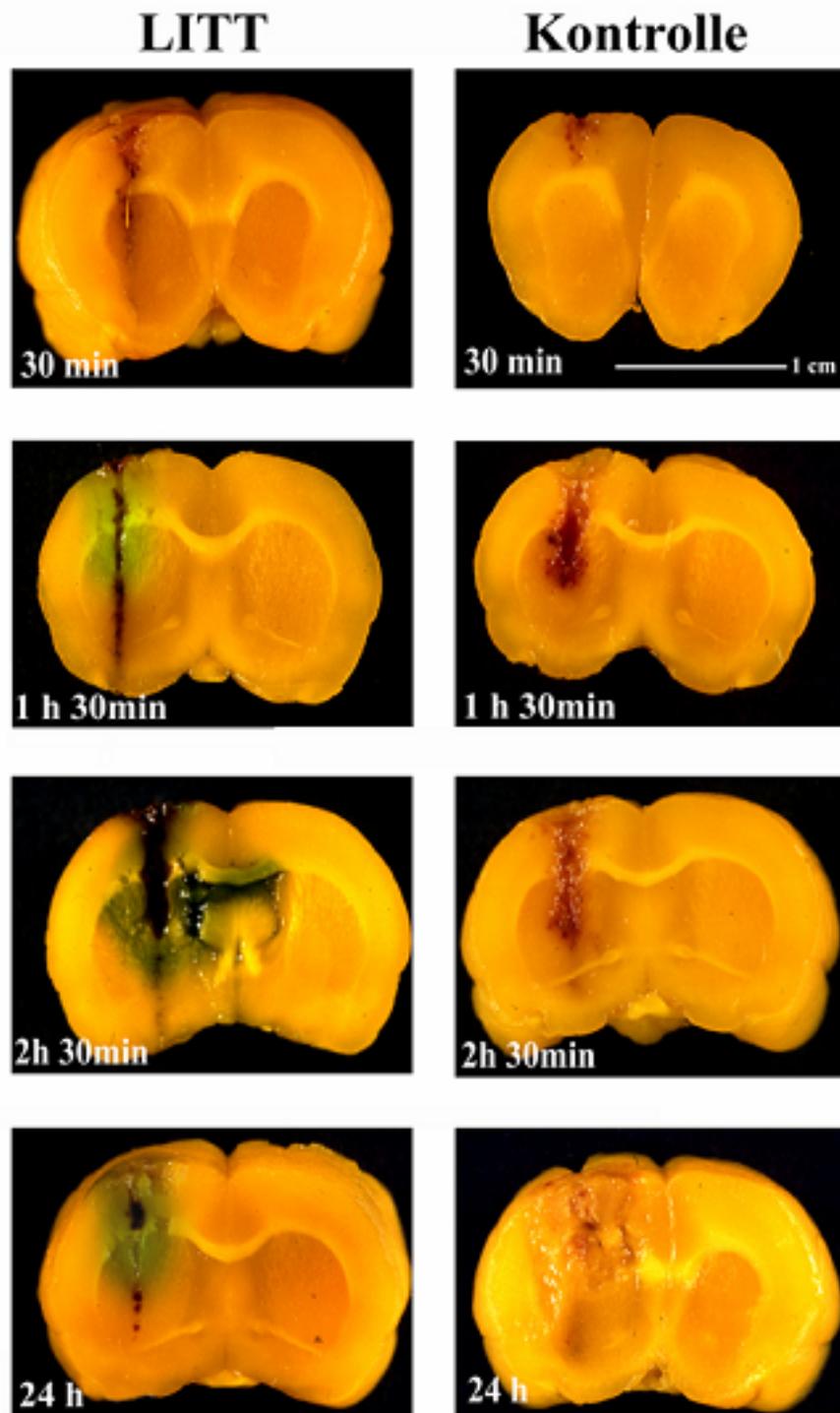


Abb. 5: Nachweis der Eröffnung der BHS für Albumin durch LITT. Blaufärbung markiert den Austritt des Evans- Blue- Albumin Komplexes. Beachte den ausgeprägten Austritt von Albumin 2h30min nach LITT mit Beteiligung des Balkens. Kein Kontrolltier (nur Einführen des Lichtleiters) weist eine Blaufärbung des Gewebes auf.

3.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE ERGEBNISSE

Insgesamt konnten 20 Tiere ausgewertet werden. Pro Zeitpunkt (30 min, 2h 30min, 24h und 48h nach Behandlung) konnten jeweils 3 bestrahlte Tiere ausgewertet werden, bei 2 Kontrolltieren pro Zeitpunkt war lediglich der Lichtleiter eingeführt worden.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen mit Antikörpern gegen C₃C (MG 185 KD), Fibrinogen (MG 340 KD) und IgM (MG 971kd) waren im wesentlichen identisch.

Bei den Kontrolltieren beschränkte sich die Läsion, die durch das Einführen des Lichtleiters ohne nachfolgende Laserbestrahlung entstand, auf die Dimension des Lichtleiters (Abb. 6). Zu allen Zeitpunkten erkannte man lediglich eine diskrete Immunreaktivität der Markerproteine um den Bereich des Lichtleiters. Die Läsionszone war eng um den Stichkanal begrenzt (Abb. 6).

Bei den laserbehandelten Tieren wurden im Zeitverlauf morphologische Veränderungen der Läsionszone sichtbar (Abb. 6). 30min nach Laserapplikation war die Demarkierungszone eng um den Stichkanal begrenzt, es zeigte sich keine Immunreaktivität (IR) für IgM (Abb. 6), C₃C oder Fibrinogen (Daten nicht gezeigt). 2h 30min nach Laserbestrahlung demarkierte sich ein ovaloides Areal mit intensiver IR für IgM (Abb. 6), C₃C oder Fibrinogen (Daten nicht gezeigt). Der an die Läsion angrenzende Balken wies in seinen medialen Anteilen eine bis an die Mittellinie angrenzende IR auf. 24h und 48h nach Lasertherapie nahm die IR für alle untersuchten Antikörper im Bereich der Laserläsion diskret ab. Hingegen kam es zu einer deutlichen Ausweitung der Immunreaktivität für IgM (Abb. 6), C₃C oder Fibrinogen (Daten nicht gezeigt) in die ipsilateralen Balkenanteile und über die Mittellinie bis nach kontralateral.

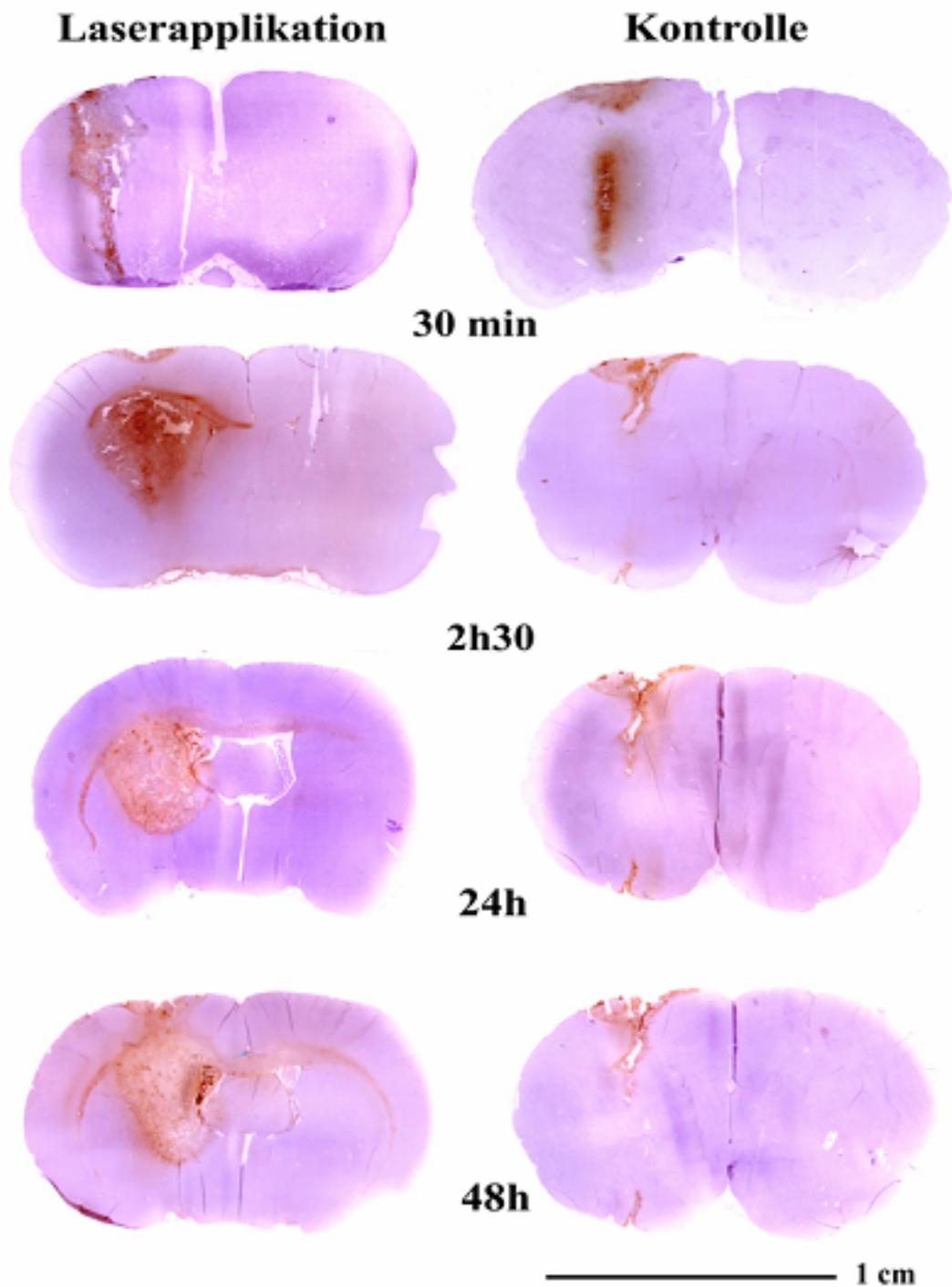


Abb. 6: Immunohistochemischer Nachweis von IgM IR im Rattenhirn. Linke Spalte: Zustand nach Einführen des Lasers ohne Bestrahlung. 2h30 demarkiert sich ein ovales Areal mit intensiver IgM IR mit Ausbreitung in den Balken, im Zeitverlauf bis in den kontralateralen Balken. Bei den Kontrolltieren bleibt die IR im wesentl. auf den Stichkanal begrenzt.

3.3 ERGEBNISSE DER HPLC

11 Ratten (5 bestrahlte Tiere, 4 chirurgische Kontrollen, 2 nur perfundierte Tiere) konnten ausgewertet werden. 3 Ratten verstarben vor Abschluß der Perfusion, bei einer Ratte kam es zu einer Dislokation des Katheters vor Abschluß der Perfusion mit Paclitaxel. Paclitaxel konnte in allen laserbestrahlten Gehirnen 2 h 30min nach LITT nachgewiesen werden (Abb.13 und Tab.1). Sichtbar wird dies durch den Peak in Abbildung 13, der in Form und Position dem Taxolpeak entspricht. Die dabei nachgewiesenen Konzentrationen im gesamten Gehirn lagen zwischen $0,07\mu\text{g/g}$ und $0,9\mu\text{g/g}$ (Mittelwert $0,268$; Standardabweichung $0,3585$, Tab. 1). Im Serum der Ratten wurden 2h 30min nach LITT Konzentrationen zwischen $13,1$ und $30,53\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen (Mittelwert $20,0$; Standardabweichung $7,2$; Tab. 1). In den Kontrollen wurden Serumwerte von $8,9$ bis $25,69\mu\text{g/ml}$ (Tab. 1) gemessen. Nach Läsion ohne Bestrahlung wurde im Gehirn ein Paclitaxel Wert von $0,04$ bis $0,058\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen (Mittelwert $0,04$; Standardabweichung $0,0131$; Tab.1). Nach Perfusion ohne chirurgische Läsion wurde lediglich in einem Tier Paclitaxel im Gehirngewebe nachgewiesen (Tab. 1).

3.3.1 STATISTISCHE ANALYSE DER HPLC-ERGEBNISSE

Die statistische Analyse erfolgte mit der Statistiksoftware SAS Version 8TM. Der exakte nichtparametrische Vergleich der Gruppen mittels des Kruskal-Wallis Tests ergab einen signifikanten Unterschied der verglichenen Gruppen bzgl. der Konzentration von Paclitaxel im Gehirngewebe ($p < 0,0008$). Die Serumkonzentrationen von Paclitaxel unterschieden sich zwischen den untersuchten Gruppen nicht ($p < 0,85$). Ein paarweiser Vergleich mittels des Wilcoxon Rangtests wies einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der laserbehandelten Tiere und der chirurgischen Kontrolle ($p < 0,01$) nach. Der Vergleich dieser beiden Gruppen mit den nur perfundierten Tieren ($n=2$) erreichte aufgrund der geringen Fallzahl keine Signifikanz.

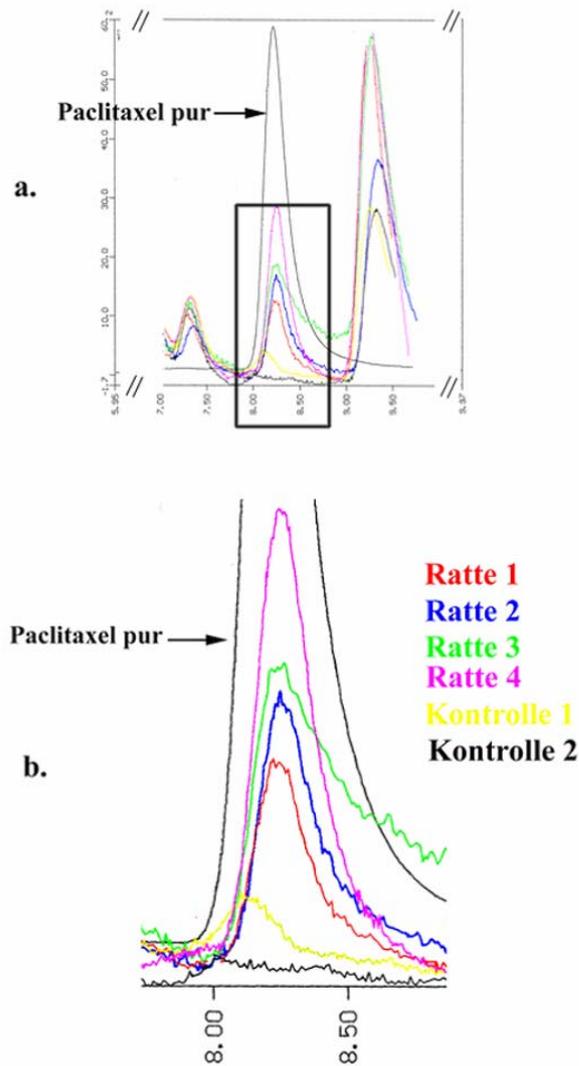


Abb. 7: Nachweis von Paclitaxel im Gehirn der Ratte mittels HPLC.
 a. Übersicht, Paclitaxel pur verursacht einen Peak ca. 8,25 min nach Injektion in die Säule. b. Detail aus a. Ratten 1-4 (2h 30 min nach Laserbestrahlung und Perfusion mit 10 mg Paclitaxel/kg Körpergewicht) weisen eindeutige Paclitaxel-Peaks auf, Kontrolle 1 (Einführen des Lichtleiters ohne Bestrahlung mit Perfusion wie oben) niedriger Paclitaxel Peak, Kontrolle 2 (keine Läsion, nur Perfusion wie oben) kein Nachweis von Paclitaxel.

3. Ergebnisse

Tabelle 1:

Ergebnisse der HPLC-Analyse 2h30min nach Laserbestrahlung:

Ratte 1-5 (Parameter 3Watt/ 30sec) und 1h30min nach Perfusion mit Paclitaxel (10mg/kgKG).

Ratte 6 –9 (Chx. Kontrolle) Einführen des Lichtleiters wie bei Ratten 1-4, keine Laserbestrahlung.

Ratte 10-11 nur Perfusion. MW: Mittelwert, Stabw: Standardabweichung.

Ratte	Behandlung	$\mu\text{g Txl/g}$ <i>HG</i>	$\mu\text{g Txl/ml}$ <i>Serum</i>
1	Laser	0,0742	20,35
2	Laser	0,0898	30,53
3	Laser	0,1336	13,47
4	Laser	0,137	22,78
5	Laser	0,908	13,19
	Mittelwert	0,2685	20,064
	Stabw	0,3585	7,2063
6	Chx	0,028	13,81
7	Chx	0,04	15,33
8	Chx	0,058	8,9
9	Chx	0,051	23,79
	Mittelwert	0,0442	15,457
	Stabw	0,0131	6,195
10	Perfusion	0	25,69
11	Perfusion	0,017	10,76
	Mittelwert	0,0085	18,225
	Stabw	0,0120	10,557

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte die lokoregionale Eröffnung der BHS durch den Nd-YAG Laser unter dem Aspekt einer potentiell therapeutisch zu nutzenden Eröffnung der BHS für Chemotherapeutika im Tierexperiment untersucht werden.

In vorausgegangenen Studien konnte das Eindringen von Serumalbumin in das Gehirngewebe der Ratte nach Nd-YAG Laserbestrahlung bereits nachgewiesen werden, jedoch keine Aussagen über den Zeitverlauf der BHS Eröffnung gemacht werden.

Die Tatsache, dass Evans-Blue an Serumalbumin bindet, wurde in dieser Arbeit ausgenutzt, um den Nachweis einer zum Zeitpunkt der Applikation von Evans-Blue bestehenden Eröffnung der BHS zu führen. In einem ersten Versuchsansatz konnte das Eindringen des blau gefärbten Evans-Blue-Albumin-Komplexes erstmals nach 1.30 h nach Laserapplikation (p.l.) in schwacher Ausprägung beobachtet werden. Nach 2.30h kam es zu einem deutlichen Austritt des Evans-Blue Albumin Komplexes, der sich über den Balken in die kontralaterale Hemisphäre fortsetzte. 24 h p.l. wurde lediglich eine sehr schwache Blaufärbung in der Läsionsregion festgestellt. Die Untersuchungen konnten somit den Beginn der laserinduzierten Eröffnung der BHS nach ca. 1h 30min p.l. festlegen.

Die Gruppe von Kiessling et al. konnte nach Nd-YAG Laserbestrahlung der Hirnoberfläche bei Ratten bereits 30 min nach Applikation eines Laserpulses (30W/1sec) die Extravasation von Plasmaproteinen nachweisen. Dabei wurde das Immunglobulin IgG untersucht. Nach 1h war der Austritt der IgG Moleküle auf die Läsion beschränkt, wies jedoch im weiteren Verlauf eine Ausbreitung entlang der Markfasern bis in die kontralaterale Hemisphäre auf (Kiessling et al. 1990). Diese Ergebnisse, obwohl aufgrund der unterschiedlichen Tracer nicht vollständig vergleichbar, entsprechen der hier vorgestellten Beobachtung des Übertrittes des Evans-Blue-Albumin-Komplexes in den Balken (Abb.5). 24 h nach Laserbestrahlung zeigte sich ein gegenüber dem Zeitpunkt 2 h 30 min verringerter Austritt des Evans-Blue-Albumin-Komplexes (Abb.5), bei dem insbesondere eine Balkenbeteiligung nicht mehr nachweisbar war.

Die Beobachtung, daß kein Kontrolltier einen Austritt des Evans-Blue Albumin Komplexes im Bereich der Stichkanalläsion aufwies, obwohl makroskopische Blutungen im Stichkanal festzustellen sind, ist unerwartet. Möglicherweise ist die rein mechanisch induzierte Läsion nicht ausreichend, um bei diesen makroskopischen Untersuchungen eine optisch sichtbare Menge des Evans-Blue Albumin Komplexes austreten zu lassen.

Die Beobachtung, dass Bestrahlung des vitalen Gehirngewebes durch den Nd-YAG Laser einen Austritt von Serumproteinen in das umliegende Gehirngewebe induzieren konnte (Schober et al. 1993; Sabel, 1994; Kiessling et al. 1990) stellte einen wichtigen Hinweis auf eine möglicherweise therapeutisch zu nutzende, lokoregionale Eröffnung der BHS dar. Insbesondere war die Beobachtung des ausgedehnten Austrittes von Serumalbumin von besonderer Bedeutung (Abb.8).



Abb. 8: Nachweis der BHS Störung nach LITT im normalen Rattenhirn. Austritt von Serumalbumin. Immunhistochemischer Nachweis von Albumin nach PAP- Methode. Laserparameter (5 Watt, 60 sec.). Beachte, daß die hier angewandte Laserenergie weit über der in vorliegenden Arbeit angewandeten liegt. (3 Watt 30 sec.) (Abb. aus Sabel M. Dissertation ,Düsseldorf 1994)

Die meisten Medikamente werden im Serum an Proteine gebunden. Eine besondere Rolle kommt hierbei dem Serumalbumin zu, das praktisch alle nicht lipophilen, sauren Pharmaka reversibel bindet. Insbesondere Chemotherapeutika wie Paclitaxel werden bis zu 90% an Serumproteine, wie z.B. Albumin, gebunden und können somit aufgrund der Eigenschaften der BHS nicht in das Gehirngewebe eindringen (Forth et al. 1999, de Vita et al. 1999). Ein Eindringen von Serumproteinen in das ZNS nach systemischer Gabe eines Chemotherapeutikums mit hoher Plasmaeiweißbindung (praktisch alle angewandten, nicht lipophilen Chemotherapeutika, (vgl. de Vita et al. 1999 und Forth et al. 1999), würde somit dem Eindringen des Chemotherapeutikums in das Interstitium des Gehirns gleichkommen.

In den bei dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Serumproteine C3C (MG 185 KD), Fibrinogen (MG 340 KD) und IgM (MG 971kd) ein praktisch identisches Ausbreitungsmuster aufwiesen. Der in Abb. 6 gezeigte immunhistochemische Nachweis von IgM zeigt vergleichbar mit den Ergebnissen der Evans-Blue Untersuchungen 2,30 h nach LITT eine starke IR für dieses Serumprotein im Bereich der Laserläsion mit Ausbreitung in den Balken. Im Zeitverlauf weitete sich die IR für die untersuchten Proteine in den kontralateralen Balken aus und ist auch nach 48h mit intensiver IR nachweisbar. Interessanterweise konnte im Gegensatz zu der intensiven IR für C3C, Fibrinogen und IgM (Abb. 12) 24 h p.l. nur ein diskreter Austritt des Evans-Blue-Albumin-Komplexes nachgewiesen werden. Dies könnte die Hypothese nahelegen, daß die BHS nur temporär geöffnet ist und es sich bei der hier gezeigten Ausbreitung der IR für IgM über den Balken um einen Diffusionsprozeß aus dem Läsionsareal heraus handelt. Andererseits ist die Sensitivität des Nachweises des Evans-Blue-Albumin Komplexes offensichtlich deutlich geringer als der immunhistochemische Nachweis der Serumproteine C3C, Fibrinogen und IgM, die eindeutig im Bereich des Stichkanals der Kontrolltiere nachweisbar waren. Hierzu paßt auch die Beobachtung von Ohmoto, der nach Hochfrequenz induzierter Hyperthermie eine Extravasation von Evans-Blue nur in Fällen massiver Störungen der Blut-Hirn-Schranke feststellte (Ohmoto et al. 1996). Die Genese der laserinduzierten BHS-Störung ist z. Zt. noch nicht abschließend

geklärt. Die ursächliche Noxe für die laserinduzierten Gewebsveränderungen ist die vom Lichtleiter auf das umliegende Gewebe übertragene Hitze. In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte eine Störung der Blut-Hirn-Schranke erst durch Temperaturen von mindestens 41°C erreicht werden (Shivers et al. 1988, Wijnsman und Shivers, 1993, Ikeda et al., 1994).

In früheren Untersuchungen konnten die laserinduzierten Temperaturveränderungen in dem hier angewendeten Modell determiniert werden. Dabei zeigte sich nach Laserbestrahlung mit 3Watt über 30 sec ein Temperaturmaximum an der Lichtleiterspitze von 70° C. Dieses Temperaturmaximum fiel bis zu einem Abstand von 7 mm auf Normaltemperatur ab (Schober et al. 1993; Sabel, 1994). Temperaturen von 40°C wurden in einem Radius von ca. 2-3 mm erreicht. Somit wurden die notwendigen Temperaturen zum Eröffnen der BHS in dem vorliegenden Experiment erreicht.

In den mit diesen Parametern behandelten Gehirnen konnten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen generalisierte Schädigungen zellulärer und subzellulärer Membranen nachgewiesen werden. Dabei stellten sich jedoch die Basalmembranen der Kapillaren intakt dar (Schober et al. 1993; Sabel, 1994). Somit scheint es sich nicht um eine direkte Schädigung der Gefäßmembranen zu handeln. Trout et al. nahmen als Ursache der erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke nach physikalischen Traumata eine Stimulation der Polyaminsynthese im Kapillarendothelium an (Trout et al. 1986). Dies könnte auch ein wesentlicher Mediator der Blut-Hirn-Schrankenstörung nach interstitieller Laserbestrahlung sein, da gerade die Hyperthermie einen Stimulus für eine erhöhte Polyaminsynthese darstellt (Harari et al. 1989; Millan et al. 1979). Wijnsman konnte zeigen, daß Hitzebehandlung im Mäusegehirn zu einer Aufnahme von Horseradish Peroxidase Reaktionsprodukten in pinocytischen Vesikeln, tubulo-vesikulären Komplexen, transendothelialen Kanälen und dem Zytoplasma der Endothelzellen führen kann (Wijnsman et al. 1993).

Besonders interessant für eine mögliche klinische Anwendung der LITT ist der hier geführte Nachweis eines laserinduzierten Eindringens von Paclitaxel in das Gehirngewebe der Ratte. Paclitaxel gehört zu der Gruppe der Taxane, einer

wichtigen neuen Gruppe von Zytostatika, die durch ihre ausgezeichnete zytostatische Potenz eine der wichtigsten neuentdeckten Zytostatika in der letzten Dekade darstellen (de Vita et al. 1999). Die Gruppe von Horwitz et al. identifizierte 1979 den zytostatischen Mechanismus von Paclitaxel (Schiff, Horwitz, 1980; Schiff et al. 1979; Manfredi et al. 1982; Manfredi, Horwitz, 1984). Paclitaxel bindet an Tubulin und benutzt dabei eine andere Bindungsstelle als Colchizin oder die Epipodophyllotoxine. Bereits submikromolare Konzentrationen der Taxane verändern das Gleichgewicht zwischen der Bildung von Tubulindimeren und Microtubuli, so daß die Polymerisation der für die Zellteilung notwendigen Mikrotubuli verhindert wird. Damit induzieren die Taxane einen Block der Mitose am Übergang Metaphase/Anaphase und lösen den programmierten Zelltod (Apoptose) aus. Für Paclitaxel wurde in neueren Studien ein ausgeprägter strahlensensibilisierender Effekt festgestellt, verursacht durch die Inhibition des Zell-Zyklus in der G (2) Phase, der radiosensitivsten Phase des Zell-Zyklus (Tishler et al. 1992a; Tishler et al. 1992b).

Die bisher selten beobachteten Resistenzen gegen Taxane paßten in das Muster der P-Glykoprotein (PgP) induzierten multiple-drug resistance (MDR) (Sonnichsen et al. 1994). Eine Untersuchung von 2002 durch Fellner zeigte eine Erhöhung der intrazerebralen Paclitaxel Konzentration durch Inhibition von P-Glykoprotein (Fellner S. et al. 2002). In anderen Untersuchungen an 15 frühen Glioblastom Zellkulturen konnte mittels Microtiter-Tetrazolium-Assay (MTT-Testung) kein Fall einer primären Chemoresistenz gegenüber Paclitaxel beobachtet werden. Dabei wurden die Zellkulturen mit einer Konzentration von 6,8 µg Paclitaxel/ml behandelt (Mecklenburg, 1997).

Aufgrund der obengenannten Eigenschaften, insbesondere der seltenen Resistenzentwicklungen, wurde der Einsatz von Paclitaxel zur Behandlung maligner Gliome untersucht. Terzis et al. berichteten über eine Hemmung der Proliferation, Migration und Invasion humaner Gliomzellen durch Paclitaxel *in vitro* (Terzis et al. 1997). Es folgten Phase I und Phase II Studien zur Behandlung maligner Gliome mit Paclitaxel, die jedoch nur ein sehr diskretes Ansprechen auf Paclitaxel bei weniger als 35% der Behandlungen zeigten (Glantz et al. 1996; Prados et al. 1996). 2002 führte Schuck eine Phase I/II

Studie durch, um den strahlensensibilisierenden Effekt von Paclitaxel bei der adjuvanten Therapie von malignen Gliomen zu untersuchen (Schuck et al. 2002). Insgesamt wurden in einer Dosisfindungsstudie 81 Patienten untersucht. Ein positiver Effekt auf die Überlebenszeit konnte nicht beobachtet werden.

Als Ursache für die enttäuschenden Ergebnisse der Anwendung von Paclitaxel bei malignen Gliomen muss die bereits 1995 von Glantz nachgewiesene fehlende Penetration von Paclitaxel in das ZNS von Ratten und der cerebrospinalen Flüssigkeit von Patienten angenommen werden (Glantz et al. 1995).

Diese Beobachtung wurde in den aufgeführten Untersuchungen an einem nicht läsierten Kontrolltier bestätigt, in dessen Gehirn trotz hohem Serumspiegel kein Paclitaxel nachweisbar war.

Nach LITT gelang der Nachweis von Paclitaxel im Gehirn von allen bestrahlten Ratten. In den Untersuchungen konnte Paclitaxel 2h 30min p.l. im Hirngewebe nachgewiesen werden (Abb. 7). Die ermittelten Konzentrationen der untersuchten Rattengehirne lagen im Mittel bei 2,21 µg/mg Gehirngewebe. Aufgrund der oben dargestellten Befunde ist von einer lokoregionalen Eröffnung der BHS auszugehen. Setzt man voraus, daß die Laserläsion etwa ein Drittel des Gehirngewebes der Ratte erfaßt, sind 3-fach höhere Konzentrationen Paclitaxel lokoregional anzunehmen. Die durch LITT erreichbaren Konzentrationen im Bereich der Schrankenstörung liegen somit mit hoher Wahrscheinlichkeit im Bereich der zytotoxischen Konzentrationen *in vitro* (6,8µg/ml Paclitaxel, s.o.).

Die Beobachtung, daß auch im Gehirn des chirurgischen Kontrolltieres Paclitaxel nachweisbar war, entspricht den immunhistochemischen Befunden, die eine eindeutige IR für Serumproteine im Stichkanal nachwiesen.

Da Paclitaxel zu etwa 97% an Albumin gebunden wird (Longnecker et al. 1987), ist davon auszugehen, dass die Präsenz von Paclitaxel im Gehirngewebe eng mit dem Einstrom von Serumalbumin in das Gehirngewebe korreliert. Damit erscheint es wahrscheinlich, dass Paclitaxel beladenes Serumalbumin nicht nur in den Bereich der Laserläsion einströmt, sondern wie in Abb. 5 dokumentiert, auch in das umliegende Gewebe. Insbesondere durch das Eindringen entlang der Strukturen, die auch migrierenden Tumorzellen als

Wachstumsstraßen (Markfasern, Balkenfasern) könnte eine dem Wachstumsmuster des Tumors folgende Verteilung der Chemotherapeutika erzielt werden.

Ein weiterer Vorteil dieser Methodik ergibt sich durch die besonderen technischen Merkmale der Applikation. Bei LITT handelt es sich um eine stereotaktisch applizierbare, minimal invasive Methode, welche die Applikation von interstitieller Nd-YAG Laserenergie unter direkter MRT-Kontrolle ermöglicht. Die Gruppe von Leonardi wendete diese Methode an 24 Patienten mit Gliomen an, um die Zusammenhänge zwischen Nekrose und absoluter Energiedosis zu untersuchen. Es konnte keine lineare Beziehung zwischen beiden Parametern gefunden werden. Auch zeigte sich kein Unterschied beim Vergleich von Tumoren verschiedener Differenzierungsgrade. Leonardi schloss aus den Untersuchungen, dass die stereotaktisch geführte LITT eine gut durchführbare und sichere Methode ist, wobei die max. Energiedosis individuell an den Patienten angepasst werden muß. Durch die Durchführung repetitiver T1-gewichteter 3D-turbo-FLASH Sequenzen ist eine genaue Abschätzung der Läsionsgröße während der Therapie möglich (Leonardi MA et al. 2001, 2002). Durch die präzise stereotaktische Applikationsmöglichkeit und die Möglichkeit der Echtzeitkontrolle der Applikation, bietet sich diese Methode insbesondere für die Therapie tief liegender oder sich in eloquenten Regionen befindenden malignen Hirntumoren an (Bettag et al. 1991; Kahn et al. 1994; Sugiyama et al. 1990). Durch den Nachweis der laserinduzierten BHS-Eröffnung könnte sich zusätzlich zu der zytoreduktiven Wirkung der Lasertherapie die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie anbieten. Schulze untersuchte den Effekt von LITT an Proliferations- und Apoptoserate von Gliomzellen in Ratten. Die Gruppe zeigte eine Destruktion der Gliomzellen in der Läsionszone, allerdings wurden die Zellen in der Mantelzone nicht geschädigt. Diese wuchsen sekundär in die nekrotische Läsionszone ein (Schulze et al. 2001).

Da die Mehrzahl maligner Hirntumoren postoperativ bestrahlt werden und bei zahlreichen Zytostatika eine strahlensensibilisierende Wirkung nachgewiesen wurde, ist der Aspekt einer adjuvanten Chemotherapie nach LITT besonders interessant.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte der tierexperimentelle Nachweis einer lokoregionalen Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke der Ratte mittels Nd-YAG Laser geführt werden. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß die laser-induzierte Eröffnung der BHS das Eindringen von Serumalbumin in das Gehirngewebe ermöglicht. Durch den intrazerebralen immunhistochemischen Nachweis von weiteren Serumproteinen mit erheblich größeren Molekulargewichten als Albumin wurde gezeigt, daß selbst IgM Proteine mit einem Molekulargewicht von 900 KD nach Lasertherapie die BHS überschreiten können.

Die Hypothese, daß an Serumproteine gebundene Chemotherapeutika mittels laser-induzierter Eröffnung in das Gehirngewebe eindringen können, wurde durch direkten Substanznachweis eines unter Kontrollbedingungen nicht in das ZNS penetrierten Chemotherapeutikums (Paclitaxel) geführt. Die Verteilung des eindringenden Serumproteins impliziert ein Eindringen über die Läsionsgrenzen hinaus in das umliegende Gehirngewebe und entlang der Markfasern bis auf die Gegenseite des Rattenhirns. Diese tierexperimentellen Ergebnisse haben ein interessantes klinisches Potential. In klinischen Arbeiten konnte die sichere Durchführung der laser-induzierten interstitiellen Thermotherapie (LITT) an tiefliegenden Tumoren gezeigt werden. Besondere Merkmale dieser Technik sind die Möglichkeiten der Stereotaktischen Applikation und die Online-Kontrolle durch die Durchführung von Kernspintomographien während der Therapie. Diese Eigenschaften machen die verwendete Methode, insbesondere für die Behandlung tiefliegender Hirntumoren attraktiv. Die hier beschriebenen Beobachtungen können den Einsatz des Lasers noch erweitern, da sich basierend auf diese Daten der kombinierte Einsatz von gewebsdestruierender Laserbestrahlung mit einer lokoregionalen Chemotherapie anbieten würde. Da alle bösartigen Hirntumoren bestrahlt werden, wäre auch eine Kombination von LITT, LITT-assoziiertes Chemotherapie und Bestrahlung denkbar. Insbesondere die Kombination der stereotaktisch geführten Bestrahlung ist aufgrund der strahlensensitiveren Wirkung von Chemotherapeutika wie Paclitaxel zumindest theoretisch sinnvoll.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Albert FK, Forsting M, Sartor K, Adams HP, Kunze S (1994) Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis [see comments]. *Neurosurgery* 34: 45-60

Bettag M, Ulrich F, Schober R, Furst G, Langen KJ, Sabel M, Kiwit JC (1991) Stereotactic laser therapy in cerebral gliomas. *Acta Neurochir Suppl Wien* 52: 81-83

Black KL, King WA, Ikezaki K (1990) Selective opening of the blood-tumor barrier by intracarotid infusion of leukotriene C4. *J Neurosurg* 72: 912-916

Bradburg M (1984) The structure and function of the blood-brain barrier. *FASEB J* 186-190

Brightman MW (1977) Morphology of blood-brain interfaces. *Exp Eye Res* 25 Suppl: 1-25

Brightman MW, Reese TS, Feder N (1970) Assessment with the electron microscope of the permeability of peroxidase of cerebral endothelium and epithelium in mice and sharks. In: Crone C, Lassen NA (eds) *Capillary permeability*. Copenhagen, Munksgaard, pp 463

Burger PC, Heinz ER, Shibata T, Kleihues P (1988) Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 698-704

Cairncross G, Macdonald D, Ludwin S, Lee D, Cascino T, Buckner J, Fulton D, Dropcho E, Stewart D, Schold C, Jr., et al (1994) Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 12: 2013-2021

Cloughesy TF, Gobin YP, Black KL, Vinuela F, Taft F, Kadkhoda B, Kabbinavar F (1997) Intra-arterial carboplatin chemotherapy for brain tumors: a dose escalation study based on cerebral blood flow. *J Neurooncol* 35: 121-131

Cornford EM (1985) The blood-brain barrier, a dynamic regulatory interface. *Mol Physiol* 219-260

de Vita, VT, Hellman, S, Rosenberg, SA (1999) *Principles and Practice of Oncology*. 5.th edition. Lippincott Raven,

Evans AE, Jenkin RD, Sposto R, Ortega JA, Wilson CB, Wara W, Ertel IJ, Kramer S, Chang CH, Leikin SL, et al (1990) The treatment of medulloblastoma. Results of a prospective randomized trial of radiation therapy with and without CCNU, vincristine, and prednisone. *J Neurosurg* 72: 572-582

Fadul, C; Wood, J; Thaler, H; Galicich, J; Patterson, RH; Posner, JB (1988) Morbidity and mortality of craniotomy for excision of supratentorial gliomas. *Neurology* 38: 1374-1379

Fellner S, Bauer B, Miller DS, Schaffrik M, Fankhanel M, Spruss T, Bernhardt G, Graeff C, Farber L, Gschaidmeier H, Buschauer A, Fricker G (2002) Transport of paclitaxel across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J Clin Invest*; 110(9):1309-18

Fenstermacher JD, Cowles AL (1977) Theoretic limitations of intracarotid infusions in brain tumor chemotherapy. *Cancer Treat Rep* 61: 519-526

Ford J, Osborn C, Barton T, Bleehen NM (1998) A phase I study of intravenous RMP-7 with carboplatin in patients with progression of malignant glioma. *Eur J Cancer* 34: 1807-1811

Forth, W, Henschler, D, Rummel, W, Starke, K (1999) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

Fransen P, de Tribolet N (1993) Surgery of supratentorial tumors. *Curr Opin Oncol* 5:450-457

Glantz MJ, Choy H, Kearns CM, Cole BF, Mills P, Zuhowski EG, Saris S, Rhodes CH, Stopa E, Egorin MJ (1996) Phase I study of weekly outpatient paclitaxel and concurrent cranial irradiation in adults with astrocytomas. *J Clin Oncol* 14: 600-609

Glantz MJ, Choy H, Kearns CM, Mills PC, Wahlberg LU, Zuhowski EG, Calabresi P, Egorin MJ (1995) Paclitaxel disposition in plasma and central nervous systems of humans and rats with brain tumors. *J Natl Cancer Inst* 87: 1077-1081

Green SB, Byar DP, Walker MD, Pistenmaa DA, Alexander E, Jr., Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, Mealey J, Jr., Odom GL, Paoletti P, Ransohoff J2, Robertson JT, Selker RG, Shapiro WR, Smith KR, Jr., Wilson CB, Strike TA (1983) Comparisons of carmustine, procarbazine, and high-dose methylprednisolone as additions to surgery and radiotherapy for the treatment of malignant glioma. *Cancer Treat Rep* 67: 121-132

Greenberg HS, Ensminger WD, Seeger JF, Kindt GW, Chandler F, Doan K, Dakhil SR (1981) Intra-arterial BCNU chemotherapy for the treatment of malignant gliomas of the central nervous system: a preliminary report. *Cancer Treat Rep* 65: 803-810

Groothuis DR, Fischer JM, Lapin G, Bigner DD, Vick NA (1982) Permeability of different experimental brain tumor models to horseradish peroxidase. *J Neuropathol Exp Neurol* 41: 164-185

Harari PM, Fuller DJ, Gerner EW (1989) Heat shock stimulates polyamine oxidation by two distinct mechanisms in mammalian cell cultures. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16: 451-457

Hirano A, Becker NH, Zimmerman HM (1969) Pathological alterations in the cerebral endothelial cell barrier to peroxidase. *Arch Neurol* 20: 300-308

Ikeda N, Hayashida O, Kameda H, Ito H, Matsuda T (1994) Experimental study on thermal damage to dog normal brain. *Int J Hyperthermia* 10(4):553-61

Kahn T, Bettag M, Harth T, Schwabe B, Schwarzmaier HJ, Modder U (1996) [Laser-induced interstitial induced hyperthermia of cerebral tumors with nuclear magnetic resonance tomography control]. *Radiologe* 36: 713-721

Kahn T, Bettag M, Ulrich F, Schwarzmaier HJ, Schober R, Furst G, Modder U (1994) MRI-guided laser-induced interstitial thermotherapy of cerebral neoplasms. *J Comput Assist Tomogr* 18: 519-532

Kahn T, Harth T, Bettag M, Schwabe B, Ulrich F, Schwarzmaier HJ, Modder U (1997) Preliminary experience with the application of gadolinium-DTPA before MR imaging-guided laser-induced interstitial thermotherapy of brain tumors. *J Magn Reson Imaging* 7: 226-229

Kiessling M, Herchenhan E, Eggert HR (1990) Cerebrovascular and metabolic effects on the rat brain of focal Nd:YAG laser irradiation. *J Neurosurg* 73: 909-917

Kiwit JCW, Floeth FW, Bock WJ (1996) Survival in malignant glioma: Analysis of prognostic factors with special regard to cytoreductive surgery. *Zentralbl Neurochir* 76-88

Kroll RA, Neuwelt EA (1998) Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery* 42: 1083-1099

Kumagai AK, Eisenberg JB, Pardridge WM (1987) Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a beta-endorphin-cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. Model system of blood-brain barrier transport. *J Biol Chem* 262: 15214-15219

Lantos PL, Van den Berg SR, Kleihues P (1996) Graham DI, Lantos PI (eds) *Tumours of the Nervous System*. 6th edition. Arnold, London, pp 583-879

Leibel, SA., Sheline, G.E. (1991) *Tolerance of the brain and spinal cord to conventional irradiation*. New York: Raven press; 239-256

Leonardi MA, Lumenta CB (2002) Stereotactic guided laser-induced interstitial thermotherapy (SLITT) in gliomas with intraoperative morphologic monitoring in an open MR: clinical experience. *Min. Invasive Neurosurg* ; 45(5):201-7

Leonardi MA, Lumenta CB, Gumprecht HK, von Einsiedel GH, Wilhelm T (2001): Stereotactic guided laser-induced interstitial thermotherapy (SLITT) in gliomas with intraoperative morphologic monitoring in an open MR-unit. *Min Invasive Neurosurg* ;44(1):37-42

Levin VA, Edwards MS, Wright DC, Seager ML, Schimberg TP, Townsend JJ, Wilson CB (1980) Modified procarbazine, CCNU, and vincristine (PCV 3) combination chemotherapy in the treatment of malignant brain tumors. *Cancer Treat Rep* 64: 237-244

Levin VA, Freeman Dove M, Landahl HD (1975) Permeability characteristics of brain adjacent to tumors in rats. *Arch Neurol* 32: 785-791

Levin VA, Wilson CB, Vestnys PS (1981) Primary intracranial gliomas: clinical studies and treatment regimens of the Brain Tumor Research Center, University of California, San Francisco, 1977-1979. *Cancer Treat Rep* 65 Suppl 2: 83-88

Longnecker SM, Donehower RC, Cates AE, Chen TL, Brundrett RB, Grochow LB, Ettinger DS, Colvin M (1987) High-performance liquid chromatographic assay for taxol in human plasma and urine and pharmacokinetics in a phase I trial [published erratum appears in *Cancer Treat Rep* 1987 Mar;71(3):340]. *Cancer Treat Rep* 71: 53-59

Mahaley MS, Jr., Hipp SW, Dropcho EJ, Bertsch L, Cush S, Tirey T, Gillespie GY (1989) Intracarotid cisplatin chemotherapy for recurrent gliomas. *J Neurosurg* 70: 371-378

Manfredi JJ, Horwitz SB (1984) Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther* 25: 83-125

Manfredi JJ, Parness J, Horwitz SB (1982) Taxol binds to cellular microtubules. *J Cell Biol* 94: 688-696

Mecklenburg I (1997) Untersuchungen zur in vitro Sensitivität von Paclitaxel in Primärenzellkulturen glialer Tumoren. *Dissertationsarbeit Duesseldorf*:

Millan N, Murdock LL, Bleier R, Siegel FL (1979) Effects of acute hyperthermia on polyribosomes, in vivo protein synthesis and ornithine decarboxylase activity in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 32: 311-317

Millay RH, Klein ML, Shults WT, Dahlborg SA, Neuwelt EA (1986) Maculopathy associated with combination chemotherapy and osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am J Ophthalmol* 102: 626-632

Neuwelt EA, Barnett PA, Bigner DD, Frenkel EP (1982) Effects of adrenal cortical steroids and osmotic blood-brain barrier opening on methotrexate delivery to gliomas in the rodent: the factor of the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 4420-4423

Neuwelt EA, Hill SA, Frenkel EP (1984) Osmotic blood-brain barrier modification and combination chemotherapy: concurrent tumor regression in areas of barrier opening and progression in brain regions distant to barrier opening. *Neurosurgery* 15: 362-366

Newton HB, Page MA, Junck L, Greenberg HS (1989) Intra-arterial cisplatin for the treatment of malignant gliomas. *J Neurooncol* 7: 39-45

Ohmoto Y, Fujisawa H, Ishikawa T, Koizumi H, Matsuda T, Ito H (1996) Sequential changes in cerebral blood flow, early neuropathological consequences and blood-brain barrier disruption following radiofrequency-induced localized hyperthermia in the rat. *Int J Hyperthermia* 12 (3): 321-34

Pardridge WM, Kumagai AK, Eisenberg JB (1987) Chimeric peptides as a vehicle for peptide pharmaceutical delivery through the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 146: 307-313

Peterson K, Paleologos N, Forsyth P, Macdonald DR, Cairncross JG (1996) Salvage chemotherapy for oligodendroglioma. *J Neurosurg* 85: 597-601

Pickles T, Goodman GB, Rheaume DE, et al (1997) Pion radiation for high grade astrocytoma: results of a randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 37:491-497

Poisson M, Pereon Y, Chiras J, Delattre JY (1991) Treatment of recurrent malignant supratentorial gliomas with carboplatin (CBDCA). *J Neurooncol* 10: 139-144

Prados MD, Schold SC, Spence AM, Berger MS, McAllister LD, Mehta MP,

Gilbert MR, Fulton D, Kuhn J, Lamborn K, Rector DJ, Chang SM (1996) Phase II study of paclitaxel in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 14: 2316-2321

Rampling R Modern aspects of radiation therapy for glial tumours of the brain. *Forum (Genova)* 1998 Jul-Sep;8(3):289-301

Roosen N, Kiwit JC, Lins E, Schirmer M, Bock WJ (1989) Adjuvant intraarterial chemotherapy with nimustine in the management of World Health Organization Grade IV gliomas of the brain. Experience at the Department of Neurosurgery of Dusseldorf University. *Cancer* 64: 1984-1994

Rosenstock JG, Evans AE, Schut L (1976) Response to vincristine of recurrent brain tumors in children. *J Neurosurg* 45: 135-140

Sabel M (1994) Untersuchungen zur interstitiellen Lasertherapie am normalen Gehirn der Ratte und dem malignen Transplantationstumor F98. In: *Neurochirurgie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*, pp 23-45

Sakaki T, Kleinert R, Ascher PW, Auer LM (1991) Acute effect of neodymium yttrium aluminium garnet laser on the cerebral cortical structure, blood-brain barrier, and pial vessel behaviour in the cat. *Acta Neurochir Wien* 109: 133-139

Salcman M (1985) The morbidity and mortality of brain tumors. A perspective on recent advances in therapy. *Neurol Clin* 3: 229-257

Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277: 665-667

Schiff PB, Horwitz SB (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 1561-1565

Schlegel U, Westphal M (1998): *Neuroonkologie*, Georg Thieme Verlag

Schober R, Bettag M, Sabel M, Ulrich F, Hessel S (1993) Fine structure of

zonal changes in experimental Nd:YAG laser-induced interstitial hyperthermia. *Lasers Surg Med* 13: 234-241

Schuck A, Muller SB, Kohler A, Konemann S, Wienstroer M, Mosler C, Rube CE, Wassmann H, Willich N, Rube C (2002) Combined radiochemotherapy with paclitaxel in the treatment of malignant glioma. *Strahlenther Onkol* 178(9):486-90

Schulze PC, Kahn T, Schwurzmaier HJ, Schober R (2001) Correlation of neuropathologic findings and phase-based MRI temperature maps in experimental laser- induced interstitial thermotherapy. *J Magn Reson Imaging* No;14(5):658

Schulze PC, Adams V, Busert C, Bettag M, Kahn T, Schober R (2002). Effects of laser-induced thermotherapy (LITT) on proliferation and apoptosis of glioma cells in rat brain transplantation tumors. *Lasers Surg Med*; 30(3):227-32

Shivers RR, Pollock M, Bowman PD, Atkinson BG (1988) The effect of heat shock on primary cultures of brain capillary endothelium: inhibition of assembly of zonulae occludentes and the synthesis of heat-shock proteins. *Eur J Cell Biol* Apr;46(1):181-95

Sonnichsen D, Hurwitz C, Pratt C, Relling MV (1994) Saturable pharmacokinetics and paclitaxel pharmacodynamics in children with solid tumors. *J Clin Oncol* 532

Sternberger L.A., Hardy P.H., Cuculis J.J., Meyer H.G. (1970): The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 18: 315-333

Stewart PA, Wiley MJ (1981) Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail--chick transplantation chimeras. *Dev Biol* 84: 183-192

Sugiyama K, Sakai T, Fujishima I, Ryu H, Uemura K, Yokoyama T (1990) Stereotactic interstitial laser-hyperthermia using Nd-YAG laser. *Stereotact Funct Neurosurg* 54-55: 501-505

Terzis AJ, Thorsen F, Heese O, Visted T, Bjerkgvig R, Dahl O, Arnold H, Gundersen G (1997) Proliferation, migration and invasion of human glioma cells exposed to paclitaxel (Taxol) in vitro. *Br J Cancer* 75: 1744-1752

Tishler RB, Geard CR, Hall EJ, Schiff PB (1992a) Taxol sensitizes human astrocytoma cells to radiation. *Cancer Res* 52: 3495-3497

Tishler RB, Schiff PB, Geard CR, Hall EJ (1992b) Taxol: a novel radiation sensitizer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22: 613-617

Tomiwa K, Hazama F, Mikawa H (1983) Neurotoxicity of vincristine after the osmotic opening of the blood-brain barrier. *Neuropathol Appl Neurobiol* 9: 345-354

Trout JJ, Koenig H, Goldstone AD, Lu CY (1986) Blood-brain barrier breakdown by cold injury. Polyamine signals mediate acute stimulation of endocytosis, vesicular transport, and microvillus formation in rat cerebral capillaries. *Lab Invest* 55: 622-631

Tseng SH, Bobola MS, Berger MS, Silber JR (1999) Characterisation of paclitaxel (taxol) sensitivity in human glioma- and medulloblastoma-derived cell lines. *Neuro-oncol* 1(2):101-8

Verbakel WF, Sauerwein W, Hideghety K, Stecher-Rasmussen F (2003) Boron concentration in brain during boron neutron capture therapy: in vivo measurements from the phase I trial EORTC 11961 using a gamma-ray telescope *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1;55(3):743-56

Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E, Jr., Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Jr., Mealey J, Jr., Owens G, Ransohoff J2, Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR, Jr., Wilson CB, Strike TA (1980) Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 303: 1323-1329

Wang JC (1991) DNA topoisomerases: why so many? *J Biol Chem* 266: 6659-6662

Warnick RE, Prados MD, Mack EE, Chandler KL, Doz F, Rabbitt JE, Malec MK (1994) A phase II study of intravenous carboplatin for the treatment of recurrent gliomas. *J Neurooncol* 19: 69-74

Wijsman JA, Shivers RR (1993) Heat stress affects blood-brain barrier permeability to horseradish peroxidase in mice. *Acta Neuropathol (Berl)* 86 (1): 49-54

7. ABKÜRZUNGEN

AAIII	anaplastisches Astrozytom WHO Grad III
AII	Astrozytom WHO Grad II
AK	Antikörper
AOAIII	anaplastisches Oligoastrozytom WHO Grad III
AOIII	anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III
mAK	monoklonale Antikörper
pAK	polyklonale Antikörper
BHS	Blut-Hirn-Schranke
GBM IV	Glioblastoma multiforme WHO Grad IV
HPLC	High performance liquid chromatography
IR	Immunreaktivität
LITT	Laser-induzierte interstitielle Thermotherapie
MRT	Magnetresonanz Tomographie
Nd-YAG	Neodyn- YAG
OAI	Oligoastrozytom WHO Grad II
OII	Oligodendrogliom WHO Grad II
p.l.	nach Laserapplikation
StdAbw	Standardabweichung

8. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei PD Dr. M. Sabel für die Betreuung bei meiner Dissertationsarbeit und die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des neuropathologischen Labors der Heinrich-Heine-Universität für die Geduld, meine ständigen Fragen zu beantworten. Allen voran Christa Mähler und Swantje Hertel für die Einführung in die Immunhistochemie und natürlich Prof. Dr. Bilzer für seine Betreuung.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. M. Kondakzi bedanken, der mich bei den HPLC-Untersuchungen unterstützte. Auch allen anderen Mitarbeitern des hämatologischen Labors der Heinrich-Heine-Universität danke ich für Ihre Geduld.

Nicht zu vergessen ist meine Familie, meine Eltern und meine Schwester, die mir dieses Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

9. CURRICULUM VITAE

Marion Gorol, geboren am 24.09.1976 in Meerbusch

SCHULAUFBILDUNG

1982 – 1986	Grundschule zum Reimel in Duisburg-Mündelheim
1986 – 1995	Reinhard und Max Mannesmann Gymnasium in Duisburg
1995	Abitur

STUDIUM

1995 – 2002	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
August 1997	Ärztliche Vorprüfung
April 1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juni 2000	United States Medical Licening Exam Step 1
April 2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001 – 2002	Praktisches Jahr Chirurgie: St. Luke's Hospital, Gwardamangia, University Hospital of Malta Innere Medizin: Spital Interlaken, Lehrkrankenhaus der Universität Bern, Schweiz Neurochirurgie: Neurochirurgische Klinik der Heinrich- Heine-Universität Düsseldorf
Mai 2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002 - 2004	Ärztin im Praktikum, Neurochirurgische Klinik der Universität Düsseldorf
seit Februar 2004	Assistenzärztin, Neurochirurgische Klinik der Universität Düsseldorf

Düsseldorf, im April 2004

Abstract zur Dissertationsschrift

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR LOKOREGIONALEN ERÖFFNUNG
DER BLUT-HIRN SCHRANKE IM RATTENMODELL DURCH DEN
NEODYN-YAG LASER**

vorgelegt von Marion Gorol

In dieser Arbeit konnte der tierexperimentelle Nachweis einer lokoregionalen Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke der Ratte mittels Nd-YAG Laser geführt werden. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß die laser-induzierte Eröffnung der BHS das Eindringen von Serumalbumin in das Gehirngewebe ermöglicht. Durch den intrazerebralen immunhistochemischen Nachweis von weiteren Serumproteinen mit erheblich größeren Molekulargewichten als Albumin wurde gezeigt, daß selbst IgM Proteine mit einem Molekulargewicht von 900 KD nach Lasertherapie die BHS überschreiten können.

Die Hypothese, daß an Serumproteine gebundene Chemotherapeutika mittels laser-induzierter Eröffnung in das Gehirngewebe eindringen können, wurde durch direkten Substanznachweis eines unter Kontrollbedingungen nicht in das ZNS penetrierten Chemotherapeutikums (Paclitaxel) geführt. Die Verteilung des eindringenden Serumproteins impliziert ein Eindringen über die Läsionsgrenzen hinaus in das umliegende Gehirngewebe und entlang der Markfasern bis auf die Gegenseite des Rattenhirns. Diese tierexperimentellen Ergebnisse haben ein interessantes klinisches Potential. In klinischen Arbeiten konnte die sichere Durchführung der laser-induzierten interstitiellen Thermotherapie (LITT) an tiefliegenden Tumoren gezeigt werden. Besondere Merkmale dieser Technik sind die Möglichkeiten der Stereotaktischen Applikation und die Online-Kontrolle durch die Durchführung von Kernspintomographien während der Therapie. Diese Eigenschaften machen die verwendete Methode, insbesondere für die Behandlung tiefliegender Hirntumoren attraktiv. Die hier beschriebenen Beobachtungen können den Einsatz des Lasers noch erweitern, da sich basierend auf diese Daten der kombinierte Einsatz von gewebsdestruierender Laserbestrahlung mit einer lokoregionalen Chemotherapie anbieten würde. Da alle bösartigen Hirntumoren bestrahlt werden, wäre auch eine Kombination von LITT, LITT-assoziierte Chemotherapie und Bestrahlung denkbar. Insbesondere die Kombination der stereotaktisch geführten Bestrahlung ist aufgrund der strahlensensitiveren Wirkung von Chemotherapeutika wie Paclitaxel zumindest theoretisch sinnvoll.

PD OA Dr. Sabel