

**Ultrasonographische Untersuchungen zur Darstellung
zerebraler Raumforderungen im Tiermodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Dirk Schulz

aus Duisburg

Giessen, 2013

Aus dem
Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
Neurochirurgische Klinik
der Universitätsklinik Giessen Marburg GmbH, Standort Giessen
Direktor: Prof. Dr. med. Eberhard Uhl

Gutachter: PD Dr. med. Ulf Nestler

Gutachter: Prof. Dr. med. Till Acker

Tag der Disputation: 17.01.2014

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	5
1.1	Das Glioblastom	5
1.1.1	Klassifikation und Epidemiologie	5
1.1.2	Pathologie	5
1.1.3	Diagnostik	7
1.1.4	Therapie	8
1.1.5	Experimentelle Therapieansätze	9
1.2	Ultrasonographie	10
1.2.1	Physikalische Grundlagen der Ultrasonographie	10
1.2.2	B-Mode	10
1.2.3	C-Mode	11
1.2.4	Doppler-Mode	12
1.2.5	Power-Mode	13
1.2.6	Ultrasonographie in der Neurochirurgie	14
1.3	Tiermodelle zur Untersuchung von Gehirntumoren	15
1.4	6-Methyl-Purin	16
1.5	Fragestellung	18
2.	MATERIALIEN	19
2.1	Instrumente	19
2.2	Verbrauchsmaterialien	19
2.3	Medikamente	21
2.4	Chemikalien	21
2.5	Versuchstiere	22
2.6	Versuchsgruppen	23
2.7	Zelllinie	23
3.	METHODEN	24
3.1	Narkose	24
3.1.1	Ketamin-Xylazin Narkose	24
3.1.2	Präoperative Vorbereitungen	24
3.2	Mikrochirurgische Kraniektomie im Tiermodell	25
3.3	Stereotaktische Injektion von 6-Methyl-Purin	26
3.3.1	Dosierungsschema des 6-Methyl-Purins	28
3.3.2	Aliquotierung des 6-Methyl-Purins	28
3.4	Zellkultur	30
3.4.1	Kultivierung eines OP-Präparates	30
3.4.1.1	Passagieren einer etablierten Zellkultur	30
3.4.2	LacZ - Nachweisfärbung	31
3.5	Stereotaktische intracerebrale Implantation von C6 LacZ Zellen im Tiermodell	33
3.6	Ultrasonographische Untersuchungstechniken	33
3.6.1	Sonographie zur Defektmessung nach 6-Methyl-Purin Gabe	33
3.6.2	Sonographie zur Tumolvolumenbestimmung	33

3.6.3	Sonographie zur Messung arterieller Blutflussgeschwindigkeiten	34
3.7	Histologische Präparate	35
3.7.1	Histologische Auswertung	35
4.	ERGEBNISSE	36
4.1	Ergebnisse der Kraniektomie	36
4.2	Ergebnisse der 6-Methyl-Purin Injektion	37
4.3	Ergebnisse der Tumorimplantation	39
4.4	Arterielle Blutflussgeschwindigkeiten	42
5.	DISKUSSION	44
5.1	Diskussion der Methodik	44
5.2	Diskussion der 6-Methyl-Purin Injektion	45
5.3	Diskussion der Tumorzellimplantation	46
5.4	Diskussion der Ultraschallergebnisse	48
5.5	Bewertung und Ausblick	50
6.	ZUSAMMENFASSUNG	52
6.1	Zusammenfassung	52
6.2	Summary	54
7.	LITERATURNACHWEIS	55
8.	ANHANG	60
8.1	Tabellenverzeichnis	60
8.2	Abbildungsverzeichnis	60
8.3	Ehrenwörtliche Erklärung	62
8.4	Danksagung	64
8.5	Lebenslauf	65

1 EINLEITUNG

1.1 Das Glioblastom

1.1.1 Klassifikation und Epidemiologie

Historisch gesehen bezog das Glioblastoma multiforme seinen Namen aus dem Mischbild der Nekrosen und Einblutungen in der Tumorschnittfläche des makroskopischen Präparates. Nach der aktuellen WHO Klassifikation gehört das Glioblastom zu den neuroepithelialen Tumoren, ist stets hochmaligne und damit dem Grad IV zuzuordnen [17]. Es wächst infiltrativ bevorzugt ins Marklager der Großhirnhemisphären. Infratentorielle Glioblastome kommen seltener vor. Das Glioblastom ist der häufigste hirneigene Tumor mit einer Inzidenz von 4 pro 100.000 Einwohner, meist ist die Altersgruppe zwischen 45 und 75 Jahren betroffen [17]. Bei jüngeren Patienten entsteht das Glioblastom teils sekundär aus einem niedergradigen Tumor, wie z.B. Astrozytom oder Oligodendrogliom. Im höheren Alter liegen zumeist de novo, also „primär“ entstandene Tumoren vor. Es sind Fälle beschrieben, bei denen es nach Ganzhirnbestrahlung im Kindesalter zwecks Behandlung von lymphatischer Leukämie oder Tinea capitis zur Glioblastomentstehung in späteren Jahren kam [31].

Trotz intensiver Bemühungen ist die Diagnose Glioblastom weiterhin infaust, die mediane Lebenserwartung liegt zwischen 12 und 15 Monaten [34, 35].

Prognostische Faktoren sind neben der Lage und der Größe des Tumors das Ausmaß der Resektion, der Karnofsky-Performance-Status, das Alter des Patienten und der Methylierungsstatus des Promotors für das O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase Gen (MGMT) [7]. Zwischenzeitlich konnten auch Mutationen des Isocitrat-Dehydrogenase 1-Gens als prognostisch relevant nachgewiesen werden [36].

1.1.2 Pathologie

Histologisch handelt es sich meist um wenig differenzierte Tumoren mit astrozytärer oder sogar oligodendroglialer Komponente. Das Glioblastom wächst mit seinen multipolaren feinen Fortsätzen infiltrativ in das umgebende, reaktiv veränderte Gewebe ein. Die Zellmorphologie ist häufig sehr variabel [Abbildung 1]. Es kommen aufgeblähte Zellen neben Riesenzellen mit unterschiedlichen Kernkonfigurationen, aber auch kleinzellige Areale vor [24]. Die polymorphen Zellkerne weisen erhöhte mitotische Aktivität auf und sind meist reich an Chromatin. Der Anteil der Zellen, die

den Proliferationsmarker KI-67 exprimieren beträgt im Mittel 15 bis 20% [3]. Typisch für das Glioblastom sind die zentralen Tumornekrosen und erheblichen pathologischen Gefäßneubildungen, die nach der WHO-Klassifikation den Unterschied zu niedergradigen, hirneigenen Tumoren ausmachen.

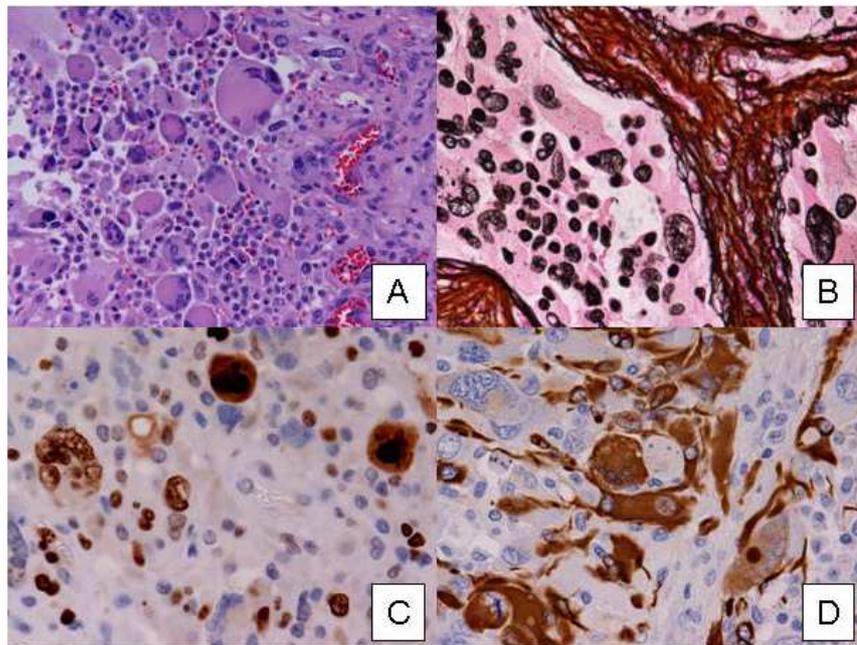
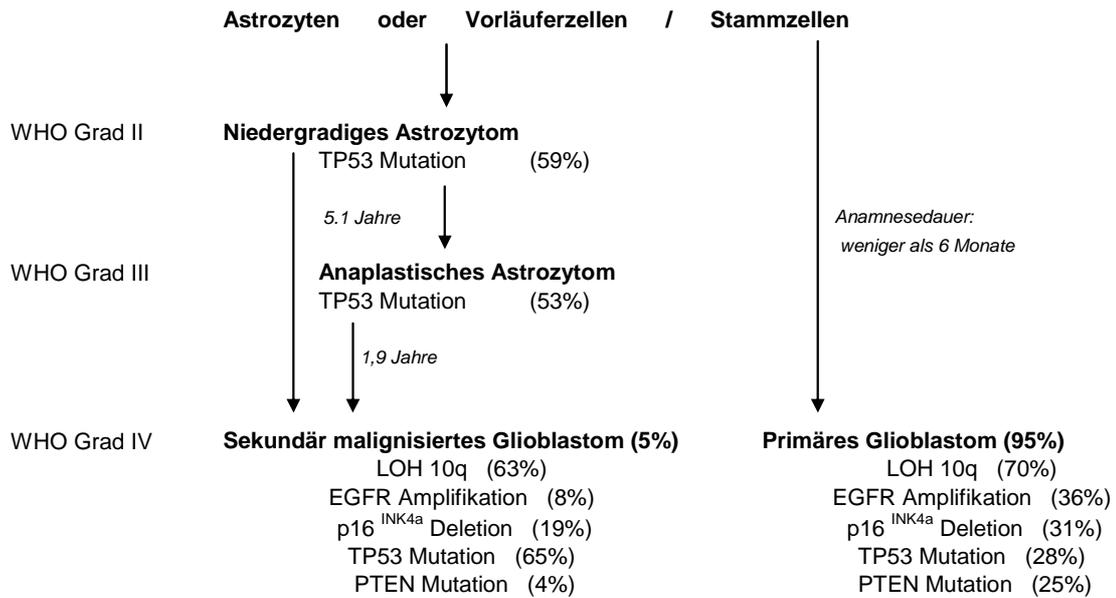


Abb. 1: Histologische Aufarbeitung eines Glioblastoms [24] (Originalvergrößerung: x400). A: Mehrkernige Riesenzellen und häufige Mitosen. B: Stroma-Komponente mit Retikulin-Faser-Färbung. C: Hohe Teilungsrate bei Nachweisfärbung des Proliferationsmarkers MIB-1. D: Tumorzellen mit starker GFAP Expression.

Für die Genese des Glioblastoms wird angenommen, dass die Summe unterschiedlicher molekularer und zellulärer Veränderungen schließlich über eine Transformation von Vorläuferzellen zur malignen Entartung führt. Dazu gehören beispielsweise die Aktivierung von Onkogenen, deren Überexpression oder Verluste von chromosomalen Genabschnitten. So finden sich in Glioblastomzellen häufig Verluste des Chromosoms 10 oder des langen Arms von Chromosom 19, zum anderen eine Amplifikation von EGFR-, CDK4- sowie MDM2-Genen [26]. Das Auftreten der Aberrationen unterscheidet sich zwischen primären und sekundären Glioblastomen [Tabelle 1].



Tab. 1: Übersicht der genetischen Veränderungen in sekundären und primären Glioblastomen (modifiziert nach [26]).

Die zwischenzeitlich in der wissenschaftlichen Literatur aufgetauchte Diskussion, ob Gliome durch Mobiltelefonbenutzung ausgelöst werden können ist nach wie vor nicht abgeschlossen. Die großen epidemiologischen Studien beschreiben diesen Zusammenhang als eher unwahrscheinlich [5].

1.1.3 Diagnostik

Das erstmalige Auftreten eines epileptischen Anfalles im Erwachsenenalter ist hochverdächtig auf das Vorliegen eines malignen intrazerebralen Prozesses und sollte eine kernspintomographische Untersuchung nach sich ziehen. Die Patienten schildern oft auch Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, sowie Müdigkeit und Abgeschlagenheit. Diese Zeichen eines erhöhten Hirndrucks können zusammen mit fokalen neurologischen Defiziten Hinweise auf die Lage der Raumforderung geben.

Neben der Notfalldiagnostik mittels Computertomographie nimmt die kraniale Magnetresonanztomographie die führende Rolle in der bildgebenden Diagnostik einer cerebralen Raumforderung ein. Unterstützend können funktionelle kernspintomographische Verfahren (MR-Spektroskopie, Apparent Diffusion Coefficient ADC) und nuklearmedizinische Verfahren, wie SPECT oder Positronen-

Emissionstomographie (PET) zur Artdiagnose und zum präoperativen Grading hinzugezogen werden [9].

Eine endgültige Diagnosesicherung kann nur durch histologische Auswertung einer Biopsie oder eines Tumorsektates erreicht werden.

1.1.4 Therapie

Die Therapie des Glioblastoms besteht aus der Kombination von Operation, Radiotherapie und Chemotherapie. Hierbei haben aktuelle Studien ergeben, dass eine Kompletresektion die Überlebenszeit nach Diagnosestellung verlängert [34]. Im Vordergrund sollte trotz aller Therapiebemühungen die Lebensqualität des Patienten stehen, was eine individuelle Abwägung und Entscheidungsfindung mit dem Patienten und seinen Angehörigen erfordert. In den letzten Jahren haben sich als operative Standardverfahren das Operationsmikroskop, die Neuronavigation und der intraoperative Ultraschall etabliert [11]. Modernste Therapieverfahren ermöglichen es, intraoperativ – ähnlich dem Ultraschall – die Vollständigkeit der Tumorsektion zu kontrollieren [37]. Die Verwendung des intraoperativen Monitorings mittels evozierter Potentiale und die Fluoreszenzresektion mittels 5-Aminolävulinsäure können die postoperativen Ergebnisse unter Schonung eloquenter Hirnareale verbessern [34; 42].

Bei Kontraindikation zur Kompletresektion werden eine erweiterte Biopsie oder eine stereotaktische Serienbiopsie angestrebt, um nach histologischer Diagnosesicherung eine adäquate adjuvante Therapieform veranlassen zu können.

In der Regel erfolgt postoperativ eine fraktionierte Bestrahlung mit insgesamt 60 Gray an 30 wochentäglichen Sitzungen. Gleichzeitig erhält der Patient eine orale Temodal-Chemotherapie mit 75mg/m² Körperoberfläche an 40 aufeinanderfolgenden Tagen. Es schließt sich eine zyklische Temodal-Gabe mit einer Dosierung von 200mg/m² Körperoberfläche (in Einzelfällen 150 mg/ m²) im Schema 5/23 über 6 Monate an [35].

In den meisten Fällen treten Rezidive auf, die eine Reoperation, eine fokussierte Strahlentherapie, eine Änderung des Chemotherapieregimes oder den Einsatz experimenteller Therapieansätze notwendig machen.

Bei unkontrollierbarem Rezidivwachstum bleibt noch die Einleitung einer palliativen Therapie, wie etwa pflegerische und krankengymnastische Maßnahmen oder eine Hirndrucktherapie mit Dexamethason oder Mannit. Die Dexamethasontherapie des

Gehirnödems wird darüber hinaus perioperativ und begleitend zur Bestrahlung regelmäßig prophylaktisch angewendet [25].

1.1.5 Experimentelle Therapieansätze

Aufgrund der weiterhin ernsten Prognose der Glioblastomkrankung wird derzeit eine Reihe von experimentellen Therapieansätzen im Rahmen von klinischen Studien erforscht. So konnte in der 2007 abgeschlossenen adenoviralen Gentherapiestudie ein Überlebensvorteil von etwa drei Monaten für Patienten der Temodalgruppe durch Hinzufügen der Gentherapie erzielt werden [10]. Derzeit wird ein adjuvantes Chemotherapieprotokoll unter Verwendung von Avastin in einer prospektiven, randomisierten, multizentrischen Phase III Studie untersucht.

Die Strategie der Gentherapie besteht darin, die genetische Information maligner Tumoren so zu verändern, dass für den Menschen ungiftige Medikamente eine tumorizide Wirkung im Malignom entfalten können. Nach Aufnahme des Gens in die Zielzelle und Expression des „fremden Enzyms“ wird nach intravenöser Gabe das ungiftige Prodrug in eine aktive, toxische Form umgewandelt, die die Tumorzelle letal schädigt („Suizid“-Gentherapie).

Als Genvektor dienen hierbei meist replikationsunfähige Retroviren oder Adenoviren. In Zellkultur ist sogar die Verwendbarkeit bakterieller Vektoren gezeigt worden [23].

Die am häufigsten verwendeten Kombinationen sind:

1. Herpes Simplex Thymidinkinase / Ganciclovir: Das toxische Produkt Ganciclovir-Monophosphat hemmt die DNA Synthese der Zelle [29].
2. Escherichia coli Cytosindesaminase / Ancotil: 5-Fluorcytosin wird in das toxische 5-Fluoruracil umgewandelt, das zur Störung der RNA- und DNA-Synthese führt [27].

In der vorliegenden Arbeit soll als Vorversuch zur Gentherapie mit Escherichia coli Purinnucleosidphosphorylase / 6-Methylpurindesoxyribosid das entstehende 6-Methyl-Purin in seiner direkten Wirkung auf Gehirngewebe untersucht werden [2]. Es interferiert mit der Biosynthese von RNA und DNA und kann so auch in gesundem Gewebe Schäden verursachen [22].

1.2 Ultrasonographie

1.2.1 Physikalische Grundlagen der Ultrasonographie

Ultraschallwellen bestehen aus periodischen Druckwellen, die sich in Form von Longitudinalwellen in Luft und Körpergewebe ausbreiten [12]. Ultraschallwellen können aufgrund ihrer hohen Frequenz (>16 kHz) vom menschlichen Ohr nicht mehr wahrgenommen werden können. Die Frequenzen des in der Medizin verwendeten Ultraschalls liegen zwischen 1 und 20MHz. Die von den Schallwellen ausgelösten Druckschwankungen führen zu einer entsprechenden Bewegung von Materieteilchen d.h., die Ausbreitung von Schallwellen erfolgt durch die direkte Ankopplung an das zu untersuchende Medium. Durch die Hin- und Zurückbewegung der Teilchen beträgt der „Nettobewegungseffekt“ eines Teilchens null, sodass Schallwellen zwar Energie einstrahlen, aber nicht Masse transportieren. Schallwellen werden mittels Frequenz (f), Wellenlänge (λ), Periodendauer (T) und Amplitude (A) beschrieben[12].

Wellenlänge und Frequenz verhalten sich umgekehrt proportional, das heißt, mit steigender Frequenz nimmt die Wellenlänge ab. Praktisch gesehen wird damit das Auflösungsvermögen für kleine Strukturen verbessert, aber die Eindringtiefe des Schalls nimmt ab. Mit hohen Frequenzen lassen sich also oberflächlich gelegene, kleine Strukturen gut darstellen.

Die Schallgeschwindigkeit hängt vom Übertragungsmedium ab. Je höher die Elastizität (K) und je geringer die spezifische Dichte (ρ) eines Material sind, desto schneller kann Schall geleitet werden. So ist die Geschwindigkeit im Knochen zum Beispiel 3600m/s während sie im Fett nur 1470 m/s ist [14]

1.2.2 B-Mode

Der in der Ultrasonographie am häufigsten genutzte Mode zeigt ein aus unterschiedlichen Graustufen zusammengesetztes zweidimensionales Bild. Dies geschieht, indem die von den Abtastzeilen empfangenen und vermessenen Echos orts aufgelöst und dann zum Teil mit einer Bildfolge von vierzehn Bildern/Sekunde an die entsprechende Position in der Bildzeile eines Computerbildschirmes zugewiesen werden, so dass der Eindruck eines Echtzeitverfahrens entsteht [12], [Abbildung 2].

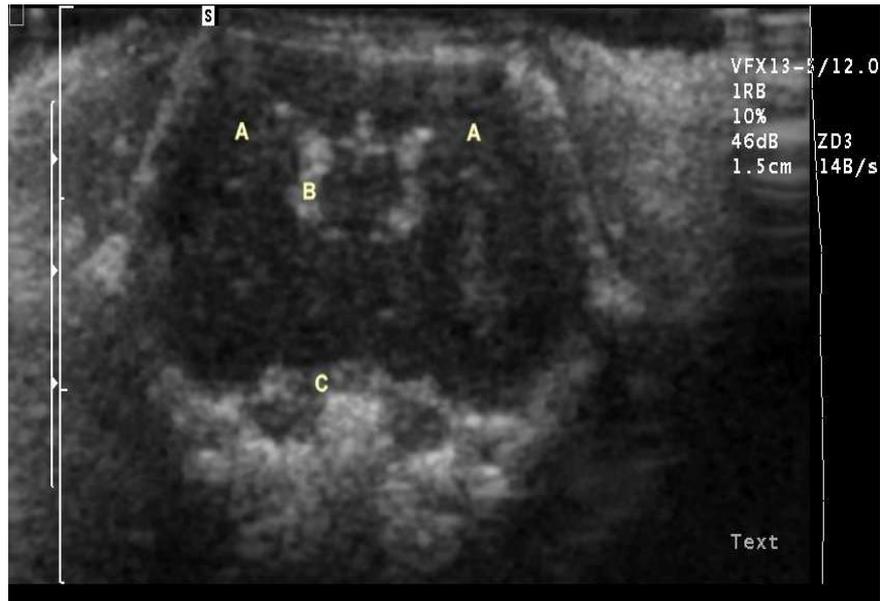


Abb. 2: Ultrasonographische koronare Darstellung eines Rattengehirns im B-Mode. Zu sehen sind die beiden Großhirnhemisphären (A), das lyraförmige Ventrikelsystem (B) und die Schädelbasis (C).

1.2.3 C-Mode

Der „colour mode“ oder auch Farbduplexsonographie genannt zeigt quasi die farbige Kodierung der Blutflussgeschwindigkeit und -richtung auf das konventionelle B-Bild. Die farbige Kodierung erfolgt durch ein Farbraster, welches aus vielen einzelnen Bildpunkten entsteht. Jeder Bildpunkt steht hierbei für die Charakteristika der Strömung. So entsteht auf dem Monitor der optische Eindruck einer Strömung [12], [Abbildung 3].

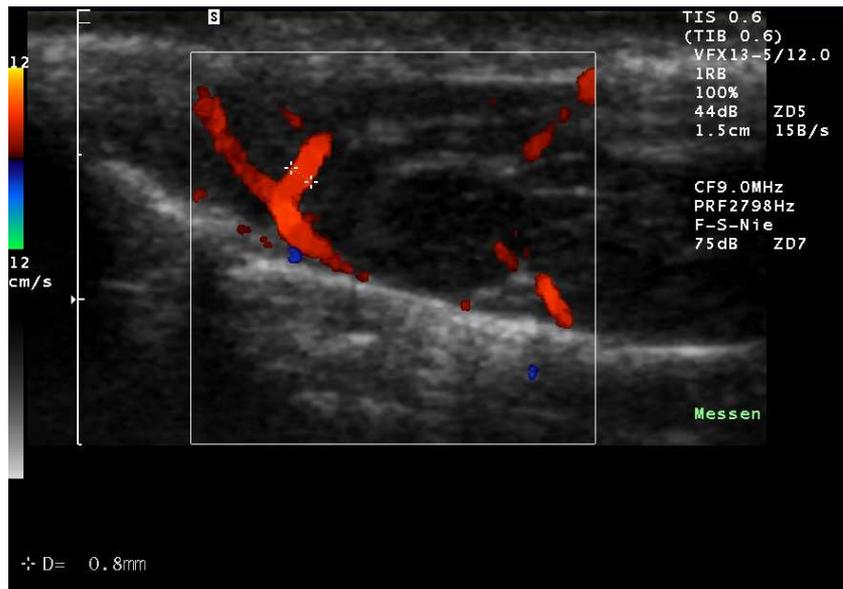


Abb. 3: Ultrasonographische sagittale Darstellung eines Rattengehirns im C-Mode. Man sieht die *A. pericallosa* (Marker+--+) sowie basal, am gegenüberliegenden Rand des C-Mode Quadrates, die *A. basilaris* auf dem Clivus liegend.

1.2.4 Doppler-Mode

Schallwellen verlassen die Schallquelle entsprechend ihrer Frequenz mit einem regelmäßigen zeitlichen Abstand. Bewegt sich ein Schallreflektor vom Empfänger weg, zum Beispiel ein Erythrozyt in einem Blutgefäß, dann legt er durch seine Relativbewegung eine bestimmte Strecke zurück. Dadurch wächst der registrierte Abstand zwischen zwei Wellenbergen beziehungsweise Wellentälern des rückgestreuten Signals, das heißt, die registrierte Wellenlänge wird größer, die registrierte Frequenz im Vergleich zum ursprünglichen Signal niedriger. Bei Bewegung eines Streuers auf die Sonde zu tritt entsprechend der umgekehrte nach dem österreichischen Physiker Doppler benannte Effekt auf, das heißt, die Frequenz des zurückgestreuten Signales bei Bewegung des Reflektors auf die Schallquelle zu wird höher [12], [Abbildung 4]. Im B-Mode Bild kann mittels Winkelkorrektur des untersuchten Blutgefäßes durch den Untersucher eingestellt werden, in welchem Winkel sich Schallausbreitung und Blutgefäß zueinander befinden. Dies erlaubt dann, die Frequenzänderung des Dopplereffektes direkt in Blutflussgeschwindigkeiten der intravasalen Erythrozyten in cm/s umzurechnen [Abbildung 4].

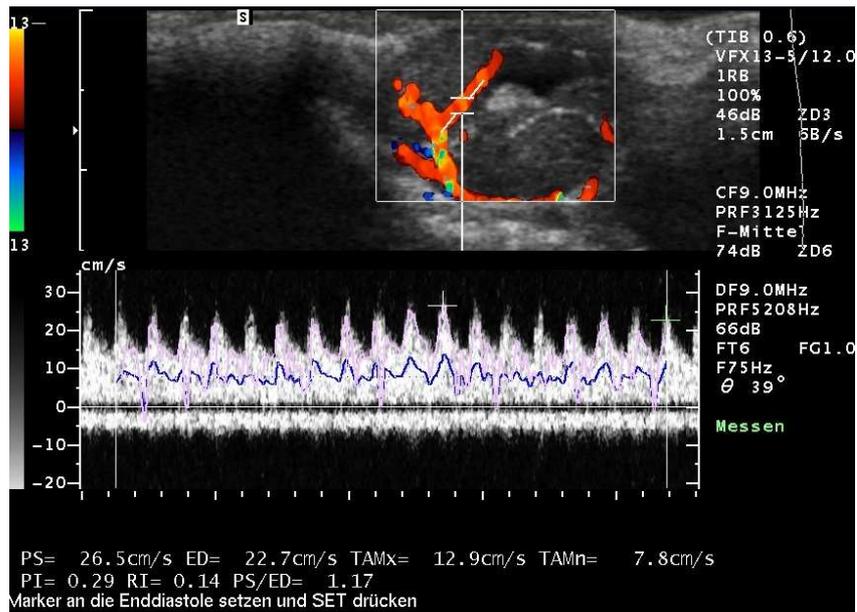


Abb. 4: *Ultrasonographische sagittale Darstellung mit winkelkorrigierter Doppler-Berechnung der Blutflussgeschwindigkeit in cm/s der A. pericallosa.*

1.2.5 Power-Mode

Beim Power-Mode, auch Angio-Mode, wird das Signal aus den Amplituden der zurückgesendeten Frequenzänderungen berechnet. Bei diesem Verfahren wird weder die Geschwindigkeit des Blutflusses gemessen noch die Richtung des Blutflusses angezeigt. Die Sensitivität der Darstellung für langsame Strömung, tief liegende Gefäße und geschlängelte Gefäßverläufe ist sehr hoch, jedoch kommt es zu einer gesteigerten Störanfälligkeit gegenüber Bewegungsartefakten [12], [Abbildung 5].

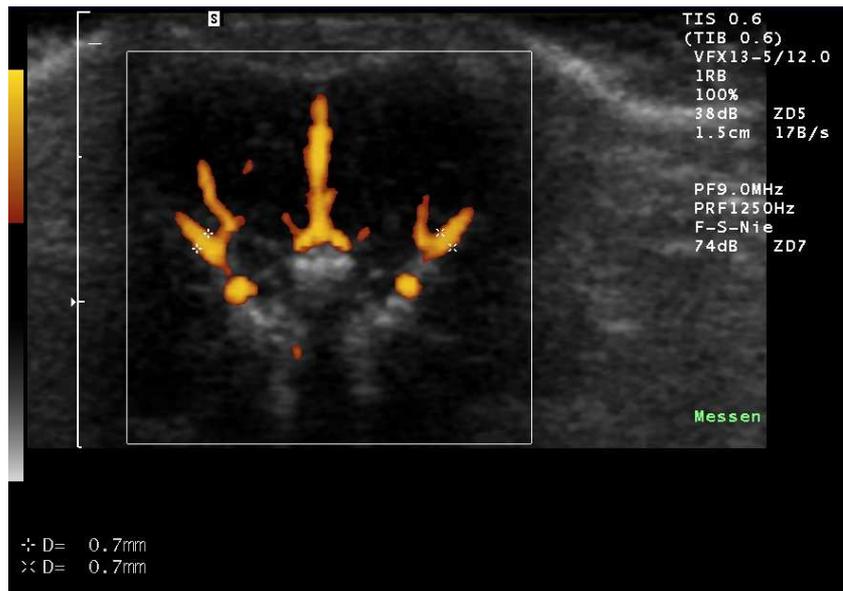


Abb. 5: *Ultraschallgraphische koronare Darstellung mit Bestimmung des Arterien­durchmessers der Aa. Mediae (Markierungen +-+, x-x) im Powermode. In der Mitte die beiden A1 Segmente sowie der Truncus arteriosus anterior in Form eines „umgedrehten Y“.*

1.2.6 Ultraschallgraphie in der Neurochirurgie

Trotz vieler Möglichkeiten der kranialen bildgebenden Verfahren in der Neurochirurgie wie zum Beispiel der kranialen Computertomographie (CCT) oder der Magnetresonanztomographie (cMRT) ist auch die Ultraschallgraphie weiterhin von unschätzbarem Wert. Sie erlaubt bildgebende Diagnostik in Echtzeit und ist dabei schnell, zuverlässig, preiswert und ohne Strahlenbelastung.

Zur Klärung kraniozerebraler Erkrankungen stehen die extrakranielle und die transkraniale Doppler-Sonographie, die farbkodierte Duplexsonographie und die transfontanelle Sonographie bei Neugeborenen und Kleinkindern zur Verfügung.

Die pränatale Sonographie zählt zu den Routineuntersuchungen, zum Beispiel zum Ausschluss von Missbildungen, Hydrozephalus oder Hirnatrophie, aber auch von Hirnblutungen bei Neugeborenen. Auch lassen sich regelmäßige Verlaufskontrollen ohne großen Aufwand und nahezu beliebig oft durchführen. Das Kind muss nicht einer Strahlenbelastung wie im CCT oder einer Sedierung wie im cMRT ausgesetzt werden.

Über die Untersuchung von Kleinkindern und Neugeborenen hinaus, eignet sich das Ultraschallverfahren auch zur Anwendung bei Erwachsenen. So ist zum Beispiel die Beurteilung der hämodynamischen intrakraniellen Parameter bei neurovaskulären Erkrankungen möglich. Mit Hilfe der transkranialen Dopplersonographie (TCD) lassen

sich die großen basalen Hirnarterien darstellen. Nach einer stattgehabten Subarachnoidalblutung (SAB) muss kontrolliert werden, ob bei dem Patienten zerebrale Vasospasmen vorliegen. Auch thrombembolische Engen lassen sich mittels der TCD herausfinden.

In der Tumorchirurgie bietet die intraoperative Ultrasonographie eine große Hilfe. Tiefer liegende Tumoranteile können lokalisiert und besser vom umgebenden gesunden Gehirn abgegrenzt und dann entfernt werden. Das gleiche gilt auch für Zysten oder intrazerebrale Abszesse.

1.3 Tiermodelle zur Untersuchung von Gehirntumoren

Verschiedene Tiermodelle zu Glioblastomen sind bisher vorgeschlagen worden, die die Situation im Menschen nachbilden, ohne jedoch die Invasivität und die Ödembildung in Gänze widerzuspiegeln. Das Beaglemodell mit J3T-Zellen geht von einer - im Gegensatz zum Menschen - immunotoleranten Situation aus und stellt große Herausforderungen an Aufzucht und Pflege, wenn große Fallzahlen bearbeitet werden sollen [28].

Das orthotope Mausmodell hat den Nachteil, dass bei der geringen Größe des Tieres der Tumor häufig in den subduralen oder subarachnoidalen Raum wächst, was zu Schwierigkeiten bei der intravitale Größenbestimmung führen kann [8].

Am häufigsten finden Rattenmodelle Anwendung [1]. Zu den etablierten Systemen zählen das Fisher 9L und das Wistar C6 Modell. Hierbei wird eine definierte Anzahl Tumorzellen in einer Tiefe von wenigen Millimetern intracerebral injiziert. Die Zelllinien 9L und C6 waren durch Aufbringen von Nitrosoharnstoffen auf das Gehirn chemisch induziert und nach Erhalt eines Tumorwachstums in Zellkultur genommen worden [1]. Da das C6 Modell in einem Auszuchtstamm generiert wurde, kann es zu einer Immunantwort führen, weshalb eine engmaschige bildgebende Kontrolle des intracerebralen Tumorwachstums notwendig wird [40]. Die Erweiterung dieses Modells mit der C6 LacZ Zelllinie erlaubt den Nachweis einzelner Tumorzellen im histologischen Schnitt mittels X-gal Färbung und somit Aussagen über Tumorzellen, Migrationstendenz und Invasionsverhalten von Gliomen.

Die Verwendung immuninkompetenter Tiere ermöglicht den Einsatz humaner Gliomzelllinien im Nagergehirn wie zum Beispiel die kommerziell erhältlichen

Zelllinien D54, U87, U373 oder sogar aus Operationspräparaten von Patienten gewonnene, und in Kultur genommene Glioblastomzellen. Hierzu sind spezielle Inkubatoren und Hygienemaßnahmen notwendig um die Tiere vor opportunistischen Krankheiten zu schützen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wistarratten C6 LacZ Modell eingesetzt, um potentielle therapeutische Effekte des 6-Methyl-Purins zu untersuchen. Die hierbei notwendige engmaschige bildgebende Kontrolle wurde mittels Ultrasonographie durchgeführt, da die regelmäßigen kernspintomographischen Untersuchungen zu einer nicht unerheblichen Belastung der Versuchstiere geführt hätten und weil für die Fragestellung einer Wachstumsverzögerung histologische post mortem Bestimmungen des Tumervolumens nicht exakt genug erschienen.

1.4 6-Methyl-Purin

6-Methyl-Purin ist ein Purinmolekül, das an seinem C6-Atom mit einer Methylgruppe substituiert ist [Abbildung 6]. Es diffundiert frei durch biologische Membranen und wird als Basenanalogen der Nukleinbase Adenin in DNA und RNA eingebaut. Es hemmt sowohl die DNA-Transkription als auch die Translation und damit die Proteinbiosynthese. Laut Angaben des Herstellers liegt die letale Dosis (LD 50) bei Anwendung auf der Haut im Tiermodell bei 200mg/kg, die Lösbarkeit in wässriger Lösung endet bei 50 µg/µl. Erste chemotherapeutische Versuche wurden vor über 50 Jahren durchgeführt und wiesen eine sehr hohe Toxizität des 6-Methyl-Purins nach. Zur Behandlung systemischer Krebserkrankungen beim Menschen haben sich Purinanaloge mit Schwefelverbindungen, wie zum Beispiel 6-Mercapto-Purin, durchgesetzt [20].

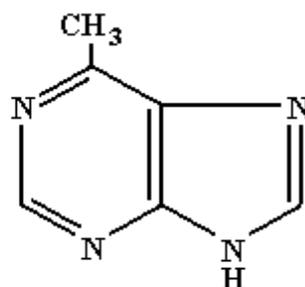


Abb. 6: 6-Methyl-Purin mit seiner Methylgruppe (CH₃) am C6-Atom

Mit der Entwicklung genterapeutischer Strategien zur Behandlung maligner Tumoren ist die Substanz wieder in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Neben den gängigen Suizidgensystemen Thymidinkinase/Ganciclovir und Cytosindesaminase/5-Fluorcytosin wurde von mehreren Arbeitsgruppen das System Purinnucleosidphosphorylase/6-Methylpurindesoxyribosid untersucht. Hierbei wird aus dem nicht giftigen Prodrug 6-Methylpurindesoxyribosid das cytotoxische 6-Methyl-Purin freigesetzt [Abbildung 7]. Die Wirksamkeit des genterapeutischen Ansatzes mittels 6-Methylpurindesoxyribosid auf Glioblastomzellen konnte bisher in Zellkulturversuchen gezeigt werden [22].

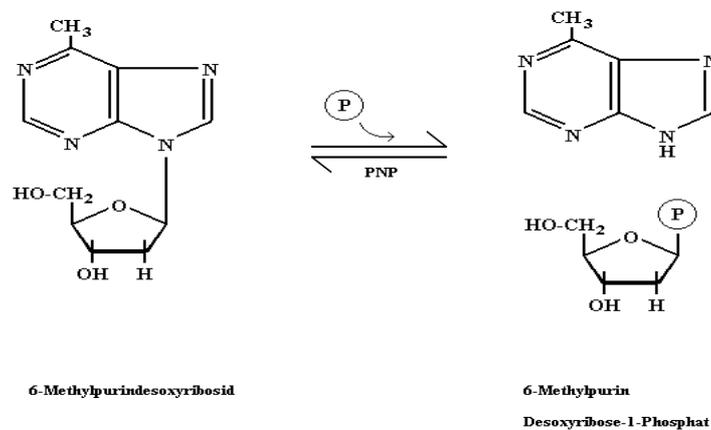


Abb. 7: Das Purinnucleosidphosphorylase/6-Methylpurindesoxyribosid System Hier wird aus dem nicht giftigen Prodrug 6-Methylpurindesoxyribosid das cytotoxische 6-Methyl-Purin freigesetzt.

1.5 Fragestellung

Die in der vorgelegten Arbeit erhobenen Daten sollen der Vorbereitung und näheren Beschreibung des experimentellen gentherapeutischen Systems PNP/6-Methylpurin-Desoxyribosid dienen, um gegebenenfalls in einem Folgeversuch den Einsatz zur gentherapeutischen Gliombehandlung zu untersuchen.

Im Einzelnen wurden die folgenden Fragestellungen bearbeitet:

1. Welche Dosis intrazerebral injizierten 6-Methyl Purins führt zu Gewebsläsionen?
2. Eignet sich das C6 LacZ Wistarratten Tumormodell zur Untersuchung intratumoraler 6-Methyl-Purin Injektionen?
3. Eignet sich die ultrasonographische Untersuchung des Rattengehirns zur Darstellung zerebraler Läsionen oder Raumforderungen?

2. Materialien

2.1 Instrumente

- Bipolar Coagulator & Bipolar Cutter; Codman & Shurtleff, Inc., Randolph, MA 02368 MA
- Bohrer Storz unidrive II plus; Karl Storz Endoskope
- Bohrhandstück 252477, Karl Storz Bohrhandstücke
- Dia Messteilung 10mm; Leica
- Dia Pfeil; Leica
- Dia Objektmikrometer; Leica
- Digitale Haushaltswaage; Tchibo GmbH, 22297 Hamburg
- Dissektor 226101 ES, Karl Storz, Tuttlingen
- Joachim F.R. König, Renate A. Klippel, The Rat Brain A Stereotaxic Atlas; The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1963 [13]
- Lidsperrerr BV007R, Aesculap, Tuttlingen
- Linear Schallkopf VFX 13-5; Siemens
- Microliter Syringes 10µl; Hamilton, Bonaduz AG, P.O. Box 26, CH7402 Bonaduz
- Microtome RM 2035; Leica
- Mikroskop Leica DMRB
- Nadelhalter BM33 005-597-01, Aesculap, Tuttlingen
- Operationsmikroskop OPMI pico; Carl ZEISS, Oberkochen
- Pinzette anatomisch 19035; Geuder, Heidelberg
- Pinzette chirurgisch OC24 inox, Aesculap, Tuttlingen
- Stanze NNS-2; Fehling Instruments, Karlstein
- Stereotaxierahmen für Nagetiere; KOPF Instruments Kalifornien, USA
- Ultraschallgerät Sono Line Elegra Advanced, Siemens, Erlangen

2.2 Verbrauchsmaterialien

- 5-0 Ethicon Vicryl TF plus 8x 45cm; Johnson & Johnson GmbH, 41470 Neuss
- 11er Feather Disposable Scalpel; Feather Safety Razor CO, LTD, Japan
- BD Eclipse Needle 27 G 1/2" (0,4mm x 13 mm); BD, Franklin Lakes, NJ 07417 USA

- BD Microlane 3 26 G 1/2" (0,45 mm x 13 mm); BD Drogheda, Ireland
- BD Plastipak Insulinspritze; Becton Dickinson S.A., Madrid, Spain
- Deckgläser 24x50 mm; R. Langenbinck, Emmendingen
- Einbettkassetten; Fa Sakura Finetek, 79219 Staufen
- Eppendorf Pipetten; Eppendorf, 22339 Hamburg
- KaVo Spray; KaVo Dental Excellence, Kaltenbach und Voigt GmbH & CoKG, D- 88400
- Objektträger 76 x 26 mm/3x1 inch; R. Langenbrinck, Emmendingen
- Spinal-Anästhesie-Lochtuch, 45 x 75 cm, Raguse Ascheberg
- Ultraschall-Gel; Arne Maass 33775 Versmold
- Untersuchungshandschuh puderfrei Größe L; NOBA Verbandmittel Danz GmbH und CoKG 58300 Wetter
- Urinbeutel 3500ml; unomedical a/s DK-3460
- Vlieskompressen 5x5 cm; Fuhrmann Verbandstoffe GmbH, Much
- Wattestäbchen steril, kleiner Kopf, Karl Beese GmbH & Co., Barsbüttel

2.3 Medikamente

- Ketamin Inresa 10ml 50mg/ml Injektionslösung; Inresa Arzneimittel GmbH Freiburg
- Pancuronium Inresa 4mg/2ml; Inresa Arzneimittel GmbH Freiburg
- Penicillin-Streptomycin; Firma DAA
- Rompun 2% Injektionslösung; Bayer Vital GmbH, 51368 Leverkusen

2.4 Chemikalien

- 6-Methyl-Purine 99%; Fa Sigma-Aldrich, Katalognummer M6502, 09419 Thum
- Aqua ad iniectabilia 10ml Flasche; Fa Braun
- Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM); Fa Gibco, New York USA
- EGTA (Ethylenglykol tetraessigsäure); Sigma-Aldrich, Seelze
- Eosin; Fa Sigma, 09419 Thum
- Essigsäure 100%; Fa Merck, 64293 Darmstadt
- Ethanol; Fa Riedel-de-Haën, 30926 Seelze
- Foetal Bovine Serum (FCS); Fa Gibco, New York USA
- Formaldehydlösung 3,5-3,7% 1 Liter; Otto Fischar GmbH & CoKG, 66067 Saarbrücken
- Glutaraldehyd; Fa Sigma, 09419 Thum
- Haematoxylin; Fa Sigma, 09419 Thum
- Kaliumhexacyanidoferrat(II) ($K_4Fe(CN)_6$); Fa Merck, 64293 Darmstadt
- Kaliumhexacyanidoferrat(III) ($K_3Fe(CN)_6$); Fa Merck, 64293 Darmstadt
- Lithiumcarbonat 0,1%; Fa Sigma, 09419 Thum
- Magnesiumchlorid ($MgCl_2$); Fa Merck, 64293 Darmstadt
- Methanol; Fa Riedel-de-Haën, 30926 Seelze
- Natriumazid (NaN_3); Fa Fluka, 4002 Basel CH
- Natriumchlorid 0,9% 10ml Flasche; Fa Braun
- Natrium-Desoxycholat 0,01%; USB
- Natriumhydroxid; Fa Merck, 64293 Darmstadt
- Paraffin; Fa Vogel Medizinische Technik und Elektronik, 35396 Giessen
- Phosphate Buffered Saline (PBS); Fa Sigma, 09419 Thum
- PIPES Disodium salt; Fa Sigma, 09419 Thum

- Propanol 50%; 75%, 90%, 100%; Fa Roth
- Salzsäure; Fa Merck, 64293 Darmstadt
- Triton X-100; Fa Sigma, 09419 Thum
- Wasserstoffperoxid-Lösung 3%; Otto Fischar GmbH & CoKG, 66067 Saarbrücken
- X-Gal (5Bromo-4Chloro-3Indolyl- β -D-Galactopyranosid); Fa Sigma, 09419 Thum
- Xylol; Fa Merck, 64293 Darmstadt

2.5 Versuchstiere

Bei den in dieser Doktorarbeit eingesetzten Labortieren, handelt es sich um weiße Wistarratten aus der Hauszucht des Instituts für Physiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen. Die Tiere sind alle weiblich, 6 - 8 Wochen alt und wiegen zwischen 200 und 300g.

Zur Unterscheidung und Individualisierung der Tiere wurden diese mittels eines nichtlöslichen Stiftes an der Schwanzwurzel farbig markiert. Die Tiere wurden unter regelmäßigem Tag-Nacht-Lichtrhythmus gehalten. Sie erhielten Wasser und Futter ad libitum.

Alle durchgeführten Versuche sind durch das Regierungspräsidium Giessen und durch das staatliche Amt für Lebensmittelüberwachung, Tierschutz und Veterinärwesen, geprüft und genehmigt worden. Antragsnummer ist das Aktenzeichen VI 63 – 19 c 20-15 (1) GI 20/18 Nr. 01/2003. Genehmigung vom 22.04.2003, Änderung vom 22.05.2003. Es folgte eine Verlängerung des Tierversuchsantrages am 08.03.2006 sowie eine zweite Verlängerung am 06.02.2007. Zum 30.04.2008 wurde die Beendigung des Tierversuchs angezeigt.

2.6 Versuchsgruppen

Insgesamt wurden 58 Tiere in die Versuche eingeschlossen. 20 Tiere dienten zur Etablierung der Technik, insbesondere der Standardisierung der Kraniotomie und der Stereotaxie zur Injektion von Methyl-Purin bzw. zur Injektion von Tumorzellen. Bei 18 Tieren wurde 6-Methyl-Purin in verschiedenen Dosierungen bzw. Kontrollmedium appliziert. 20 Tiere wurden für die Injektion von Tumorzellen verwendet.

2.7 Zelllinie

Die C6 LacZ7-Zelllinie (American Type Culture Collection, Manassas; VA 20108 USA) ist ein Subklon der C6 LacZ-Zelllinie. Die C6 LacZ-Linie entstand 1989 aus der nitrosoharnstoffinduzierten C6 Zelllinie durch eine gentechnische Veränderung des Genoms. Mittels retroviralem Transfer wurde eine Genkassette eingebracht, die als Fremdgene das E.coli lacZ Gen und eine Neomycinresistenz trägt. Durch Hinzufügen von Neomycin-artigen Substanzen in das Zellkulturmedium können nur die Zellen überleben, bei denen der Fremdgentransfer erfolgreich war. Die Selektion in Zellkultur erfolgt mit G 418. Zellen die dagegen resistent sind, exprimieren auch das LacZ-Gen, da es auf derselben Genkassette liegt. Die Expression des LacZ-Gens lässt sich mit dem beta-Gal-Assay nachweisen, dieser färbt fremdgentragende Zellen blau.

Um zu verhindern, dass die Zellen in Kultur das Fremdgen verlieren, wird der Selektionsdruck mittels Zugabe von G 418 aufrechterhalten. Bei den letzten Passagierungen vor zerebraler Implantation wird das G 418 nicht mehr hinzugefügt, um einen negativen Effekt auf das Tumorwachstum zu verhindern.

3. Methoden

3.1 Narkose

3.1.1 Ketamin-Xylazin Narkose

Vor jedem Eingriff werden die Tiere mit einer Ketamin-Xylazin-Kombinationsnarkose anästhesiert. Entsprechend des Gewichtes eines Tieres werden Ketamin 50µg/g sowie Xylazin 10µg/g verabreicht. Hierzu werden zur Injektion Ketamin 50mg/ml und Xylazin 2% in NaCl 0,9 % im Volumenverhältnis 2:1:1 gemischt. Die Injektion erfolgt intraperitoneal. Für die Narkose werden im Mittel 1-2µl aus einer Insulinspritze pro 10 Gramm Körpergewicht injiziert. Die Narkosedosis wird in µl/Gramm dokumentiert.

3.1.2 Präoperative Vorbereitungen

Die Tiere werden vor jedem operativen Eingriff bzw. ultrasonographischen Untersuchung entsprechend vorbereitet. Nach dem Wiegen erfolgt die intraperitoneale Narkose. Im Anschluss daran wird eine Rasur der Kopfhaut des Tieres vorgenommen. Die Individualisierung der Tiere erfolgt mittels farbiger Markierung der Schwanzwurzel in Ringform.

3.2 Mikrochirurgische Kraniektomie im Tiermodell

Das Tier wird in Vollnarkose beidseits meatal in den Stereotaxierahmen für Kleintiere eingespannt. Es erfolgt ein ca. 3cm langer Längsschnitt von interokulär nach interaurikulär reichend. Ein Lidsperrer wird eingesetzt, nachdem Galea und Periost nach lateral mit einem Wattetupfer weggeschoben wurden. Ein Teil des Periostes wird auf einer feuchten Kompresse aufbewahrt. Es erfolgt nun die Darstellung der knöchernen Suturen des Schädels. Der Kraniektomiedefekt soll nach lateral von den Temporalmuskeln begrenzt sein und ca. 2-3 mm nach rostral über die Sutura coronaria hinaus und posterior bis zur Sutura lambdoidea reichen. Dies entspricht in etwa einem Defekt von ca. 2cm x 1,5cm. Die Kraniektomie erfolgt mit dem Rosenbohrer unter mikroskopischer Sicht, bis man durch die Kalotte das Hirnparenchym durchscheinen sieht [Abbildung 8].

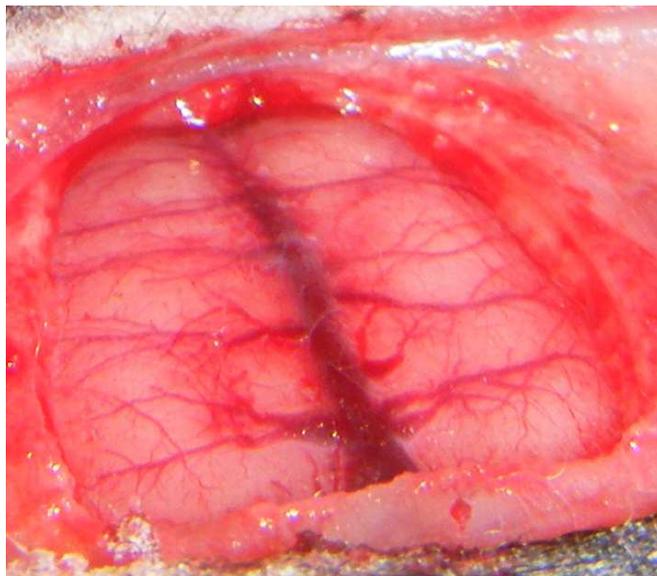


Abb. 8: *Intraoperativer Blick auf die freigelegte Hirnoberfläche mit dem mittelständigen Sinus sagittalis und den senkrecht dazu verlaufenden oberflächlichen kortikalen Venen. Die Venen unterteilen jede Hemisphärenoberfläche in vier etwa gleichgroße Quadranten.*

Es erfolgt nun die Umstellung auf einen Diamantbohrer, bis der Knochen bis auf die Tabula interna abgefräst ist, sich pergamentartig darstellt und sich teils von der Dura mater ablöst. Mit einem Mikrodissektor werden unter Vorschieben einer Mikrokomresse die restlichen Teile der Tabula interna von der Dura mater abgeschoben und geborgen. Die umgebenden Kraniektomie-Knochenränder werden mit

einer Stanze begradigt, so dass keine scharfen Kanten verbleiben. In Höhe der Sutura coronaria wird rechtsseitig eine Markierung in den Knochenrand gefräst, die später zur Orientierung bei der stereotaktischen Injektion dient.

Beim Ablösen der Tabula interna kann es insbesondere im Bereich des Sinus sagittalis superior zum Einriss der Dura mater und damit zu venösen Blutungen kommen. In der Regel stehen diese nach vorsichtiger Kompression mit dem Tupfer. Sollte dies nicht gelingen, kann das zuvor präparierte und zur Seite gelegte Periost als Durapatch fungieren und zur Blutstillung führen. Teilweise kann die Blutstillung durch bipolare Koagulation unterstützt werden. Zum Schluss erfolgt der Wundverschluss mit einem 5-0 Vicrylfaden in Einzelknopftechnik.

3.3 Stereotaktische Injektion von 6-Methyl-Purin

Die Tiere werden narkotisiert und in den Stereotaxierahmen eingespannt. Es wird in Höhe der ehemaligen Sutura coronaria rechtsseitig, 2mm lateral des Sinus sagittalis superior die Injektionsstelle markiert. Als Orientierungshilfe zum Wiederauffinden der ehemaligen Sutura coronaria wurde während der Kraniektomie in deren Höhe eine Markierung in die Linea temporalis gefräst.

Mit Hilfe eines 11er Skalpells wird die Hautoberfläche ca. 1mm weit eingeschnitten. Mit einer Subkutankanüle wird dieser Schnitt sondiert bis die Dura mater eröffnet ist. Eine Hamilton-Nadel wird in die Halterung der Stereotaxieführung eingebracht und erlaubt so, verschiedene Dosierungen des Purinanalogs 6-Methyl-Purin stereotaktisch zu injizieren.

Hierzu wird die Injektionskanüle von der Dura mater ausgehend pro Minute einen Millimeter in das Hirnparenchym vorgeschoben, bis sie in sieben Millimeter Tiefe angelangt ist. Dann wird im Abstand von 30 Sekunden die Kanüle zweimal um 1mm zurückgezogen, bis sie in einer Tiefe von 5mm im Hirnparenchym angelangt ist, dies entspricht dem Gehirnareal des Nucleus caudatus. Nun werden 5µl mit der Lösung der gewählten Konzentration des 6-Methyl-Purins injiziert. Nach der Injektion wird die Nadel in Abständen von 30 Sekunden jeweils um einen Millimeter angehoben und schließlich entfernt [Abbildung 9].

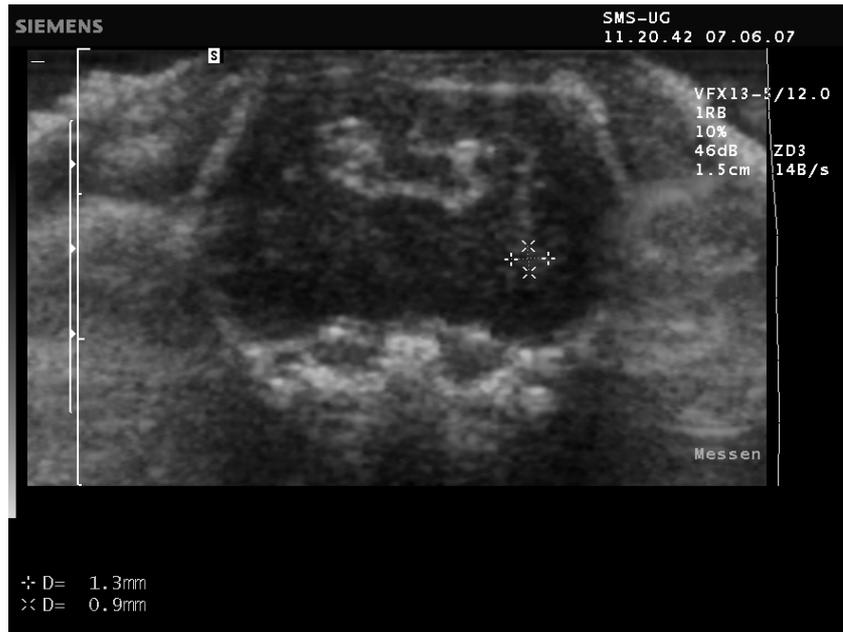


Abb. 9: Darstellung des Stichkanals nach stereotaktischer Injektion rechts thalamisch mit Volumenbestimmung (Markierung +-+ und x-x) des Injektats in coronarer Schnittebene.

Es erfolgt die ultrasonographische Defektgrößenbestimmung nach dem vorgeschriebenen Protokoll [Abbildung 10]. An Tag 14 nach Injektion werden die Tiere euthanasiert, das Gehirn entnommen und nach Formalinfixierung histologisch ausgewertet.

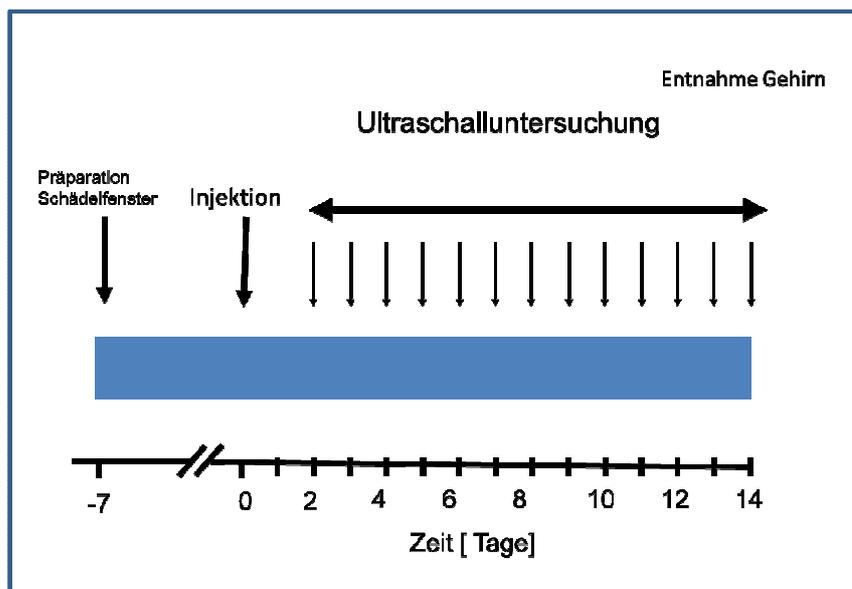


Abb 10: Experimentelles Protokoll Methylpurininjektion

3.3.1 Dosierungsschema des 6-Methyl-Purins

Zur Dosisfindung dienen 15 Tiere, je drei mit vorgesehener Dosierung: 1µg, 5µg, 20µg, 100µg, 500µg in Dosiseskulation, das heißt Abbruch des Vorversuchs bei Erreichen einer letalen Dosis. Als Kontrollgruppe werden drei Tiere mit Injektion des Lösungsmittels PBS eingesetzt. Die Defektgröße wird nach Protokoll [Abbildung 10] mittels Ultrasonographie bestimmt.

3.3.2 Aliquotierung des 6-Methyl-Purins

Die Aliquotierung wird so vorgenommen, dass durch Einspritzen von 5µl der jeweiligen Lösung die gewünschten Mengen des 6 Methyl-Purins intrazerebral erreicht werden. Aufgrund der begrenzten Lösbarkeit des Stoffes in PBS oberhalb von 50µg/µl sind Applikationen von mehr als 250µg nur als Aufschlammung möglich.

Verdünnungsschema:

1. PBS neu ansetzen

davon 125µl als Aliquot bei -20°C lagern

2. Aufschlammung 100µg/µl

15mg 6MeP in 150µl PBS, bei -20°C lagern

3. Aufschlammung 50µg/µl

15mg 6MeP in 300µl PBS, bei -20°C lagern

4. Stammlösung 20µg/µl

20mg 6MeP in 1ml (1000µl) PBS

davon 125µl als Aliquot bei -20°C lagern

5. Stammlösung 4µg/µl

von 4. (20µg/µl) 25µl + 100µl PBS, bei -20°C lagern

6. Stammlösung 1µg/µl

von 4. (20µg/µl) 7µl + 133µl PBS, bei -20°C lagern

7. Stammlösung 0.2µg/µl

von 4. (20µg/µl) 2µl + 198µl PBS, bei -20°C lagern

8. Rest von 4. (20µg/µl) bei -20°C lagern

3.4 Zellkultur

3.4.1 Kultivierung eines OP- Präparates

1. DMEM-Kulturmedium mit 10% hitzeinaktiviertem fetalen Rinderserum und 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (50mg/ml) anreichern.
2. Zellen in 5ml einer 1:1 Mischlösung aus Kulturmedium und Trypsin aufnehmen
3. Ansatz für 3 Stunden zur Enzymeinwirkung im 37°C-Brutschrank belassen
4. Lösung mild zentrifugieren und Überstand entfernen
5. Zellmaterial in Kulturflaschen mit frischem DMEM-Medium geben
6. Zellen ein bis zwei Tage später von Medium und Detritus befreien, mit frischem Kulturmedium versetzen und bis zur Konfluenz der Zellschicht züchten.

3.4.1.1 Passagieren einer etablierten Zellkultur

Die wachsenden Zellen müssen regelmäßig, wenn sie einen konfluenten Zellrasen gebildet haben, auf enzymatischem Wege voneinander getrennt werden (sog. Passagieren). Dazu:

1. Medium aus der Kulturflasche entnehmen und Zellen behutsam mit PBS überspülen
2. Zellen vorsichtig mit 2ml Trypsinlösung benetzen, wovon 1,5ml wieder entfernt werden. Die verbliebenen 0,5 ml Trypsin lösen die Zellen sowohl von der Unterlage als auch von Nachbarzellen ab. Dieser Vorgang nimmt 2-5 Minuten in Anspruch und kann durch vorsichtiges Schwenken und Abklopfen der Flasche beschleunigt werden. Eine möglichst vollständige Vereinzelung der Zellen ist anzustreben.
3. Trypsin-Zellsuspension mit Kulturmedium auf 5ml auffüllen, von dieser Lösung 0,5-1ml in der Kulturflasche belassen und den Rest verarbeiten oder verwerfen.
4. Verbliebene Zelllösung mit frischem Kulturmedium auf 5ml Gesamtvolumen auffüllen und im Brutschrank weiter kultivieren.

Die nicht benötigten, abgelösten Zellen in der DMEM-Trypsin Lösung können für Versuchszwecke vorbereitet werden. Die Zellsuspension wird hierzu mittels einer Zählkammer auf den Einzelzellgehalt hin bestimmt. Entsprechend der Zellzahl/ml wird eine Verdünnung mit frischem Kulturmedium auf den für die Versuche gewünschten Zellgehalt vorgenommen. So können beispielsweise pro Versuchstier 100.000 Zellen pro 5µl DMEM Medium für die Implantation ausgezählt werden.

3.4.2 LacZ - Nachweisfärbung

Der Nachweis des Fremdgenproduktes (E.coli- β -Galaktosidase) erfolgt durch den Beta-Gal-Assay. Dieser wird entsprechend den Empfehlungen der American Type Culture Collection (ATCC) durchgeführt:

0,125% Glutaraldehyd:

125ml Glutaraldehyd
ad 1 Liter 0,15M PBS
pH7,3 einstellen
Kühlschranklagerung

2% Paraformaldehyd:

313 μ l 0,5M EGTA in ddH₂O (pH 8,0)
2ml 1M MgCl₂ in ddH₂O
1M NaOH (pH-Justierung)
20g Paraformaldehyd
32,4g PIPES „disodium salt“
ad 1 Liter ddH₂O
pH 6,9 einstellen
Lagerung bei 4°C

Waschlösung:

1ml 1M MgCl₂ in ddH₂O
ad 500ml PBS

Färbelösung:

50mg X-Gal (5Bromo-4Chloro-3Indolyl- β -D-galactopyranosid) lösen in
1,5ml N,N-Dimethylformamid
Lagerung bei -20°C

Mixerlösung:

0,16g K₃FE(CN)₆

0,21g $K_4Fe(CN)_6$
41 μ l 1M $MgCl_2$ ddH₂O
10 μ l 0,01% Natrium-Desoxycholat in ddH₂O
20 μ l Triton X-100
ad 100ml PBS
Lagerung bei 4°C

Konservierungslösung:

0,02% NaN_3 in PBS
Lagerung bei 4°C

Die zu färbenden Zellen werden mit 2ml der 0,125%igen Glutaraldehydlösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wird die Lösung entfernt und 2 ml der 2%igen Paraformaldehydlösung werden auf die Zellen pipettiert. Diese Fixation wird bei Raumtemperatur für 4 Minuten belassen. Auch diese Lösung wird dann entfernt und die Zellen werden mit 2 ml der Waschlösung von den Fixiermittelresten befreit.

Die Waschlösung verbleibt für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf den Zellen, wird dann entfernt und ein weiterer Waschschriff schließt sich an. Um die Färbelösung fertigzustellen, werden 50 μ l der X-Gal-Lösung mit 1950 μ l der Mixerlösung frisch vermischt (1:40). Nach Entfernen des Waschlösungsüberstandes werden je 2ml der fertigen Färbelösung in die Zellkulturschälchen gegeben und der Färbeansatz über Nacht im 37°C-Brutschrank inkubiert. Die Aktivität der β -Galaktosidase kann mitunter bereits nach wenigen Minuten (15-30 min) unter herkömmlicher Durchlichtmikroskopie beobachtet werden. Hierbei zeigt sich eine kräftige nukleäre Blaufärbung der Einzelzellen.

Die Färbelösung wird dann aus dem Kulturschälchen entfernt und je 3ml der 0,02%igen Natriumazidlösung zur längeren Lagerung im Kühlschrank einpipettiert. Die Färbung bleibt so über Monate stabil und eine weitere Färbeaktivität im Hintergrund wird unterbunden.

Diese Färbung ist sowohl auf Zellen in Kulturschälchen, als auch auf Zellen im histologischen Schnitt anwendbar. In der vorliegenden Arbeit kam sie zur Kontrolle der erhaltenen Fremdgenexpression zum Einsatz. Ein intracerebraler C6 LacZ-Tumor

(2RGR 200907) wurde explantiert und zurück in Zellkultur genommen, diese Zellen wurden gefärbt.

3.5 Stereotaktische intrazerebrale Implantation von C6 LacZ Zellen im Tiermodell

Die Methodik wird analog zu der in Kapitel 3.3 beschriebenen Injektion vorgenommen, mit der Abwandlung, dass 5µl mit 100.000 C6 LacZ Zellen in das Hirnparenchym injiziert werden. Das resultierende Tumolvolumen wird nach Protokoll [Abbildung 10] mittels Ultraschalluntersuchung dokumentiert.

3.6 Ultrasonographische Untersuchungstechniken

3.6.1 Sonographie zur Defektmessung nach 6-Methyl-Purin Gabe

Die Untersuchung wird mit dem linearen Matrix-Array Schallkopf (VFX 13-5, Sonoline Elegra, Fa. Siemens) im B-Mode durchgeführt. Es werden jeweils koronare und sagittale Untersuchungen aufgezeichnet, in denen sich der Defekt, der durch das 6-Methyl-Purin induziert wurde, bestimmen lässt. Die Defektgröße wird mit der Volumenbestimmung eines Rotationsellipsoids mit der Formel: Höhe * Breite * Länge * 0,52 berechnet.

Insgesamt wurden 18 Tiere nach dieser Methode untersucht und das Ergebnis schließlich mit den Defektgrößen der histologischen Auswertungen verglichen.

3.6.2 Sonographie zur Tumolvolumenbestimmung

Es werden jeweils koronare und sagittale Untersuchungen durchgeführt, in denen sich das Tumorstadium untersuchen lässt. Die Tiere werden gemäß Protokoll [Abbildung 10] nachuntersucht. Die Bestimmung der Tumorstadiumgröße wird gleichzeitig von mindestens zwei Untersuchern durchgeführt. Der erste Untersucher führt den Schallkopf, der zweite Untersucher bedient die Konsole zum Einfrieren des Bildes und Vermessen der Tumorstadiumgröße. Dieser Untersuchungsgang wird anschließend wiederholt, nachdem die Untersucher den Arbeitsplatz getauscht haben.

Bei drei Untersuchern werden Einfrieren und Vermessen an der Konsole auf zwei Personen aufgeteilt. Die Untersuchung endet, wenn jeder Untersucher einmal die Tumorstadiumgröße vermessen hat. So entstehen drei Größenbestimmungen, bei zwei Untersuchern dementsprechend zwei Bestimmungen. Aus diesen Ergebnissen wird dann

der Mittelwert berechnet und die Tumorgröße mit der Volumenbestimmung eines Rotationsellipsoids mit der Formel: Höhe * Breite * Länge * 0,52 berechnet. Insgesamt wurden nach dieser Methode 25 Messungen an 20 Tieren durchgeführt.

3.6.3 Sonographie zur Messung arterieller Blutflussgeschwindigkeiten

Die sonographischen Untersuchungen des Rattengehirns mit dem Schallkopf VFX 13-5 ermöglichen auch die Gefäßdarstellung großer, schädelbasisnaher Arterien der Tiere. Mit dieser technischen Ausstattung ist die Untersuchung im Triplex-Modus möglich, das heißt, die gleichzeitige Darstellung von Gehirnstrukturen im B-Mode, farbkodiertem Blutfluss und die winkelkorrigierte dopplersonographische Messung der Blutflussgeschwindigkeit. Für die Bestimmung der Gefäßdurchmesser wird der Power-Mode verwendet. Die Bestimmung des Gefäßdurchmessers erfolgt über eine intraluminale Distanzmessung, die senkrecht zur Gefäßwand verläuft.

Aus den Hüllkurven des dopplersonographischen Signals werden durch das Gerät die mittlere Spitzengeschwindigkeit und die mittlere Blutflussgeschwindigkeit berechnet [Abbildung 4].

Die Gefäßuntersuchungen wurden zu Beginn der Arbeit eingesetzt, um Referenzwerte für die Größenauflösung im Millimeterbereich liegender Strukturen zu erheben und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einzuschätzen.

3.7 Histologische Präparate

Für die Auswertung der 6-Methyl-Purin Injektionen erfolgt für alle Versuchstiere am 14. Tag die Explantation des Gehirns. Hierzu wird den narkotisierten Tieren 4mg Pancuronium intraperitoneal injiziert. Nach Eintritt des Herz-Kreislauf-Stillstandes wird nach medianem Hautschnitt über der Kraniektomie das Gehirn freipräpariert und durch den Kraniektomiedefekt in toto entnommen. Es wird in Formaldehydlösung über mindestens 24 Stunden fixiert. Nach Zuschneiden der Präparate in zwei Teile, mittels eines koronaren Schnittes, parallel zur Intermeatalebene in Höhe der ehemaligen Injektionsstelle, werden diese in Paraffin eingebettet. Die histologischen Schnitte werden mit einer Dicke von 5µm angefertigt und auf die Objektträger gezogen. Diese werden fortlaufend nummeriert, um eine spätere Volumenrekonstruktion zu ermöglichen. Anschließend werden die Präparate einer Haematoxylin-Eosin-Färbung unterzogen.

3.7.1 Histologische Auswertung

Zur Läsionsgrößenbestimmung werden die Schnitte anhand ihrer Nummerierung und der dargestellten cerebralen Strukturen den zugehörigen Koordinaten im stereotaktischen Atlas von König und Klippel zugeordnet [13]. Hierdurch können erster und letzter Anschnitt einer Läsion im Mikrometerabstand von der Intermeatalebene lokalisiert werden. Die Differenz der beiden Anschnitte zueinander ergibt die Längenausdehnung in Mikrometer. Zusätzlich werden der Schnitt mit der größten Läsionshöhe und der Schnitt mit der größten Läsionsbreite vermessen. Hierzu erlaubt das Untersuchungsmikroskop das Einblenden einer Millimeterskala in den Strahlengang. Aus Längsausdehnung, größter Höhe und größter Breite wird nach der Formel eines Rotationsellipsoides das Volumen der Läsion in Mikroliter berechnet. Insgesamt wurden nach dieser Methode 1070 histologische Schnitte begutachtet und ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Kraniektomie

Die mikrochirurgische Kraniektomie resultiert in einem Defekt von ca. 2 x 1,5cm, der auch nach mehreren Monaten Beobachtungszeit nicht wieder verknöchert [Abbildung 11]. Sie ermöglicht langfristig wiederholte ultrasonographische Untersuchungen des Gehirns.



Abb. 11: Volumen-Computertomogramm der Kraniektomie. Der Defekt erstreckt sich über 2cm x 1,5cm, seitlich von der Linea temporalis beidseits und occipital durch die Lambda-naht begrenzt, nach rostral ca. 2 mm in das Os frontale reichend.

Der Eingriff war zu Beginn der Untersuchungen mit einer sehr hohen Mortalitätsrate belastet (22,4%). Diese konnte durch Abwandlung des operativen Vorgehens auf unter 10 % gesenkt werden.

Die Narkoseeinleitung hat sich hierbei als belastende Maßnahme erwiesen, deren Komplikationsrate unverändert bleibt. Bezieht man die hohe Zahl von Narkosen für die regelmäßigen Ultraschalluntersuchungen ein, so errechnet sich eine Mortalitätsrate von ca. 1,4%. Auf die Narkoseführung zur Kraniektomie bezogen liegt diese bei 3,4%.

Die Frequenz der Sinusblutungen, als eine der häufigsten perioperativen Komplikationen konnte durch den zunehmenden Einsatz von mikrochirurgischen Instrumenten und der Einführung der stumpfen Dissektion der Dura mittels

Vorschieben einer Mikrokomresse verringert werden. Sinusblutungen waren in 83,3% der Fälle mit der perioperativen Mortalität vergesellschaftet.

Die Belastung der Tiere konnte weiterhin dadurch verringert werden, dass die, zunächst zeitgleich mit der Kraniektomie erfolgende, 6-Methyl-Purin Injektion auf einen späteren Zeitpunkt nach erfolgreicher Wundheilung verlegt wurde.

Als häufigste Spätkomplikation traten in 8,6% der Tiere Abszesse auf. Davon lagen 3 im Bereich des Kraniektomiedefektes, bei einem Tier als Komplikation einer Nahtdehiszenz. Zwei Tiere entwickelten spontane, tief gelegene, intracerebrale Abszesse. Nach Veränderung und Intensivierung der Instrumentendesinfektion waren keine cerebralen Infektionen mehr zu beobachten. Ein Tier entwickelte im Laufe der Langzeitbeobachtungen subkutane abdominelle Entzündungen im Sinne von Reaktionen auf die intraperitonealen Injektionen des Narkosemittels.

4.2 Ergebnisse der 6-Methyl-Purin Injektion

Die Selektion der Tiere für die 6-Methyl-Purin Injektion erfolgte nach strengen Kriterien, wie zum Beispiel Abwesenheit einer Kontusion oder erhaltene durale Strukturen. So musste zu Beginn der Versuche eine große Zahl der Tiere zurückgestellt werden.

Insgesamt erhielten 18 Tiere Injektionen, drei davon mit PBS. Die daraus resultierenden Defektgrößen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Defektgrößen in μl	Ultrasonographisch			Histologisch		
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 1	Tier 2	Tier 3
PBS	0	0	0	0	0	0
1 μg	0	0	0	0	0	0
5 μg	0	0	0	0	0	0
20 μg	0	0	0	0	0	0
100 μg	6,19	0	18,17	0	2,69	0
500 μg	6,03	5,55	10,67	1,17	0,82	0,93

Tab. 2: 6-Methyl-Purin induzierte Läsionsgrößen im Vergleich zwischen Ultrasonographie und histologischer Auswertung.

Es zeigt sich, dass Defektbildung oberhalb einer Dosis von 100µg zu erwarten ist. Dementsprechend wurden für die Planung der intratumoralen 6-Methyl-Purin Injektionen die 3 Dosierungen 100µg, 250µg und 500µg gewählt.

Der Vergleich zwischen ultrasonographischer und histologischer Darstellung ergibt eine schlechte Korrelation. Die Messungen bei 100µg sind allesamt mit dem histologischen Befund nicht in Einklang zu bringen. Die Defektgrößen bei 500µg sind systematisch zu hoch gemessen.

Eine ultrasonographische Darstellung von Defekten mit der histologischen Größe bis 3µl ist nicht verlässlich möglich, wie die Untersuchung von Tier 2 bei 100µg zeigt. Eine ultrasonographisch gefundene Raumforderung sollte, entsprechend des Ergebnisses von Tier 3 bei 500µg, mindestens 10µl betragen und in mindestens drei aufeinanderfolgenden, voneinander unabhängigen, Untersuchungen darstellbar sein.

Die ultrasonographischen Untersuchungen der Dosierungen 100µg, PBS und 20µg wurden zu Beginn der Untersuchungsreihe durchgeführt. Als Reaktion auf die schlechte Korrelation wurde die Darstellbarkeit der intracerebralen Läsionen durch eine Abwandlung der Operationstechnik erhöht. Um die Ankopplungsschwierigkeiten des Ultraschalls im Bereich der noch Fäden tragenden Narbe zu verringern, wurden die stereotaktischen Injektionen auf einen Zeitpunkt nach Fadenentfernung verlegt, sobald die Narbe ausreichend belastbar für die Untersuchungen war.

4.3 Ergebnisse der Tumorimplantation

Eine Implantation von C6 LacZ Tumorzellen erfolgte in 20 Tieren. Entsprechend der aus den 6-Methyl-Purin-Versuchen gewonnenen Kriterien, die ein ultrasonographisch nachgewiesenes Volumen von mindestens 10 μl in drei voneinander unabhängigen Untersuchungen fordern, konnte lediglich in drei Fällen ein Tumorwachstum sicher bestätigt werden [Abbildung 12].

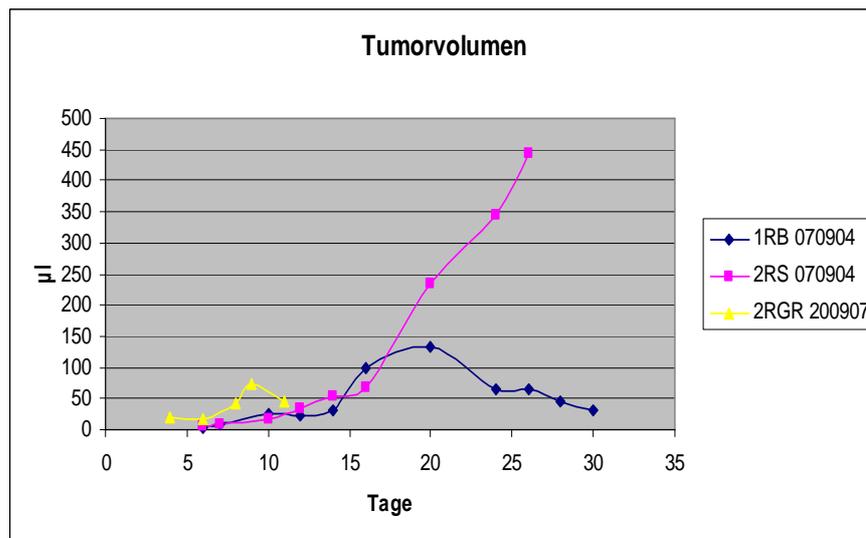


Abb. 12: Entsprechend der aus den 6-Methyl-Purin Vorversuchen gewonnenen Kriterien, die ein ultrasonographisch nachgewiesenes Volumen von mindestens 10 μl in drei voneinander unabhängigen Untersuchungen fordern, konnte lediglich in drei Fällen ein Tumorwachstum sicher bestätigt werden.

Hiervon zeigten zwei Tumore eine spontane Regressionstendenz. Bei einem dieser Tiere erfolgte nach sonographischer Sicherung der Tumorregredienz am Tag 11 die Explantation von Tumorgewebe für eine Rekultivierung in Zellkultur. Es zeigten sich vitale Zellen, die sich im Beta-Gal-Assay zu 100% blau färben ließen.

Bei dem Tier mit konstantem Wachstum musste aufgrund einer klinischen Verschlechterung mit hydrozephalem Aufstau [Abbildung 13] an Tag 26 die Explantation des Tumorgewebes zur histologischen Untersuchung vorgenommen werden [Abbildung 14]. Hierbei konnte der gesteigerte Hirndruck bestätigt werden.

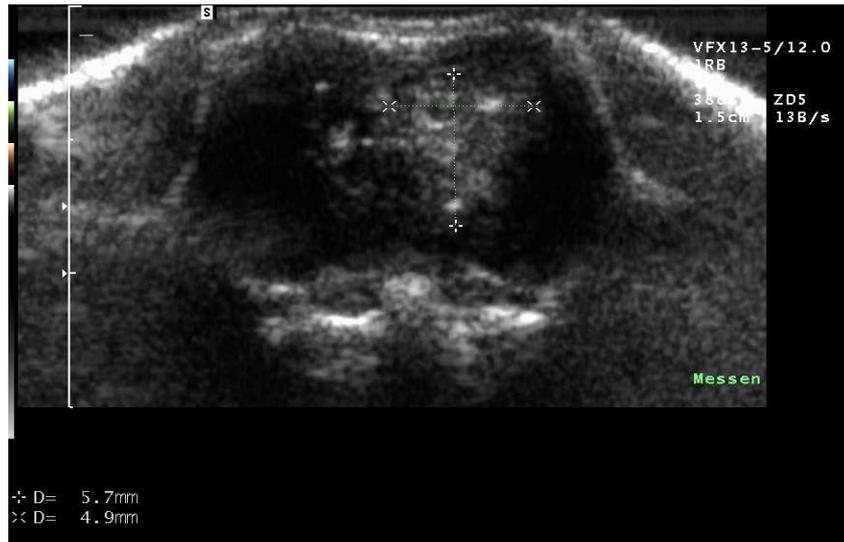


Abb. 13: Koronare Darstellung eines wachsenden Tumors im Rattengehirn. Die Messung wird in Höhe (Markierung +++) und Breite (Markierung x-x) durchgeführt. Man erkennt medial vom Tumor das verdrängte und aufgestaute Ventrikelsystem.

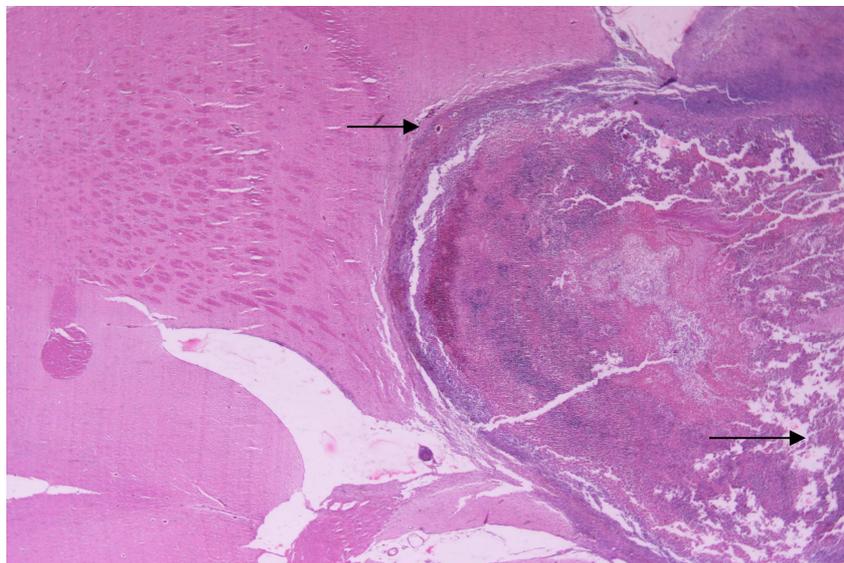


Abb. 14: Histologische Aufbereitung des entnommenen Tumors 26 Tage nach Injektion in HE Färbung. Es zeigen sich alle Kriterien, die auf einen malignen Prozess hinweisend sind, wie zentrale Nekrosen (unterer Pfeil), erhöhte Zellproliferation und pathologische Gefäßbildung (oberer Pfeil).

Bei den übrigen 17 Tieren war nach den ultrasonographischen Kriterien das Tumorwachstum nicht gegeben. In zwei Tieren, die eine früh-postoperative ultrasonographische Untersuchung erhielten, konnte in der ersten Woche zunächst ein Absinken des Läsionsvolumens gefunden werden. Zwischen Tag fünf und Tag zehn trat zwar in allen 17 Fällen eine sonographische Nachweisbarkeit ein, aber die Läsionsgrößen zeigten anschließend sehr inkonstante Verläufe mit Wendepunkten im Wachstum an den unterschiedlichsten Tagen nach Implantation [Abbildung 15].

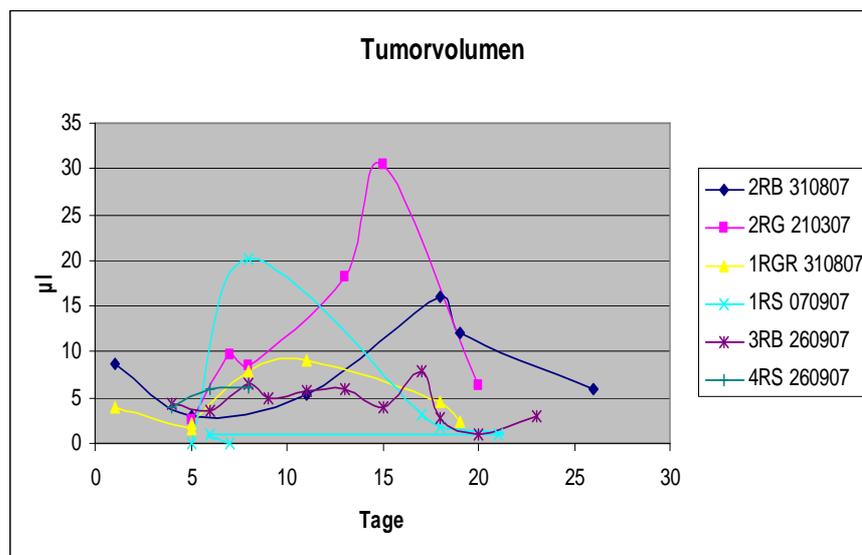


Abb. 15: Exemplarisch dargestellt 6 der 17 Tumorvolumina, die die Kriterien zum Tumornachweis nicht erfüllen konnten. Man sieht die inkonstanten Verläufe der Wachstumskurven.

Unter der Vorstellung einer immunologischen Desensibilisierung erhielten zwei Tiere eine nochmalige Tumorzellinjektion und zwei weitere Tiere sogar zwei nochmalige Implantationen, ohne dass sich ein den Kriterien genügendes Wachstum induzieren ließ.

4.4 Arterielle Blutflussgeschwindigkeiten

Bei den ultrasonographischen Gefäßuntersuchungen ließen sich die schädelbasisnahen Arterien der Ratte darstellen. Im Triplexmode wurden die Blutflussgeschwindigkeiten der Hirnarterien gemessen, im Powermode wurden Gefäßdurchmesser bestimmt. Nach Rücksprache mit der Herstellerfirma konnten die geräteseitigen Untersuchungsparameter (Programm 1RB) auf die speziellen Untersuchungsbedingungen eingestellt werden.

Die Gefäßdarstellungen waren gut reproduzierbar und die Gefäße ließen sich zur Ausrichtung der ultrasonographischen Schnittebenen als anatomische Landmarken verwenden [Abbildung 16].



Abb. 16: Der Zusammenfluss der beiden Arteriae cerebri anteriores zum Truncus arteriosus anterior („umgedrehtes Y“ aus Abbildung 5) ermöglicht die Ausrichtung des coronaren Schnittbildes in Höhe der Region des Nucleus caudatus im Bereich der stereotaktischen Injektion. Hier im Powermode dargestellt. Des Weiteren sieht man ein neoangiogenetisches, pathologisches Gefäß, welches in die rechts liegende, weißliche Raumforderung einstrahlt.

Im Gegensatz zum Menschen verfügt die Ratte nur über eine Arteria pericallosa, so dass sich im sagittalen Schnitt die Mittellinie aufsuchen lässt [Abbildungen 3 und 4]. Der Zusammenfluss der beiden Arteriae cerebri anteriores zum Truncus arteriosus anterior ermöglicht die Ausrichtung des coronaren Schnittbildes in Höhe der Region des Nucleus caudatus und im Bereich der zu erwartenden stereotaktischen Injektion.

Mit dieser Untersuchungstechnik wurden – wie in einer ausführlichen Literaturrecherche bestätigt – erstmalig dopplersonographische Angaben zu Blutflussgeschwindigkeiten in schädelbasisnahen Arterien der Ratte erhoben. Die

ermittelten Blutflussgeschwindigkeiten betragen ein Fünftel bis ein Zehntel der Geschwindigkeiten in den entsprechenden Arterien des Menschen wie Tabelle 3 zeigt. Die hohe Anzahl und die Genauigkeit der Daten erlaubte die Beschreibung und statistische Auswertung im Rahmen einer weiteren Dissertation [14].

Arterie	Flussgeschwindigkeit	Gefäßdurchmesser
	[cm / s]	[mm]
pericallosa	7,12 +/- 1,62	0,66 +/- 0,11
truncus anterior	9,07 +/- 2,37	0,73 +/- 0,14
anterior links	8,73 +/- 2,09	0,61 +/- 0,14
anterior rechts	8,11 +/- 1,65	0,60 +/- 0,14
carotis links	9,79 +/- 2,16	0,83 +/- 0,13
carotis rechts	10,06 +/- 2,12	0,82 +/- 0,11
media links	8,60 +/- 2,02	0,50 +/- 0,16
media rechts	8,14 +/- 1,90	0,49 +/- 0,14
posterior links	5,25 +/- 0,92	0,56 +/- 0,15
posterior rechts	5,12 +/- 1,00	0,57 +/- 0,13
basilaris	5,90 +/- 1,25	0,59 +/- 0,14

Tab. 3: Blutflussgeschwindigkeiten (399 Messungen in 52 Tieren) und Gefäßdurchmesser (301 Messungen in 39 Tieren) der schädelbasinaren Rattenhirnarterien [15].

Die Gefäßdurchmesser lagen im Bereich von 0,5-1 mm, und bestätigen die prinzipielle Verwendbarkeit des Ultraschalls für die Bestimmung von Distanzen im Millimeterbereich.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

Die erweiterte Kraniektomie im Rattenmodell hat sich nach Optimierung von Asepsis und Umgebungsbedingungen im Tier-OP, unter Zuhilfenahme von Operationsmikroskop und mikrochirurgischem Instrumentarium letztendlich als reproduzierbare und sichere Technik erwiesen. Nach Einführen einer postoperativen Karenzzeit zur Wundheilung vor Injektion/Implantation konnte die ultrasonographische Bildgebung deutlich verbessert werden. Im direkt postoperativen Ultraschall nach Injektion war die Bildauflösung ausreichend, um den Stichkanal darstellen zu können [Abbildung 9].

Ein Nachteil sind die Veränderungen der physiologischen Druckverhältnisse im Schädelinneren, die theoretisch zu Veränderungen der Blutflussgeschwindigkeiten führen können [6]. Auf die Größenbestimmung von Läsionen oder Tumoren dürfte die intrakranielle Druckveränderung nur geringen Einfluss haben, jedoch sind in diesem Modell Überlebenszeitstudien aufgrund des Wegfallens der Hirndrucksymptomatik nur eingeschränkt auswertbar.

Die stereotaktischen 6-Methyl-Purin Injektionen und Tumorzellimplantationen konnten mit Hilfe der zu Beginn der Kraniektomie erfolgten Markierung der Temporalschuppe sicher und reproduzierbar vorgenommen werden.

Die histologische Aufarbeitung und Volumenbestimmung der Läsionsgrößen erwies sich zwar als zeitaufwendige, aber letztendlich gut standardisierbare Vorgehensweise mit Orientierung an den Schnitten eines Stereotaxieatlanten [13].

5.2 Diskussion der 6-Methyl-Purin Injektion

Die Dosisesskalationsversuche ergaben eine nebenwirkungsarme intracerebrale Applikation bis zu 100µg 6-Methyl-Purin. Ab dieser Dosierung waren Nekrosen des Gehirngewebes zu beobachten, wobei die Notwendigkeit einer Aufschlammung der Substanz oberhalb von 50µg/µl zu Abweichungen in der letztendlich eingebrachten Stoffmenge führen kann. Die stereotaktischen Injektionen blieben allesamt ohne Blutung und ohne durch das Medikament induzierte Wundnekrosen. Für die eigentlich vorgesehenen intratumoralen Injektionen wurden die drei Dosierungen 100µg, 250µg und 500µg eingeplant, um tumorizide Wirkung mit Applikationssicherheit zu vereinbaren.

In Hinsicht auf die Vorbereitung des genterapeutischen 6-Methylpurindesoxyribosid-Modells bedeutet dies, dass die intracerebrale Entstehung des toxischen Metaboliten 6-Methyl-Purin bis 100µg toleriert wird. Aus Vorversuchen ist bekannt, dass eine Behandlung PNP-exprimierender Gliomzellen mit einer Dosis um 30µg/ml 6-Methylpurindesoxyribosid möglich ist. Da der entstehende toxische Metabolit 6-Methyl-Purin weniger Molgewicht aufweist, öffnet sich ein breites therapeutisches Fenster [22].

Es zeigte sich eine nur mäßige Übereinstimmung zwischen ultrasonographischer und histologischer Läsionsgrößenbestimmung. Dies begründet sich am ehesten mit den sehr wenigen und kleinen Läsionen, die generiert wurden. Daneben entstehen bei der histologischen Aufarbeitung Fixierungs- und Entwässerungsartefakte, die meist zu Schrumpfungsprozessen führen. Histologisch bestimmte Größen sind in der Regel kleiner als die intravitale Situation, wenn auch weniger ausgeprägt als in der vorliegenden Arbeit [32], [Tabelle 2]. Die Sichtbarkeit des Stichkanals nach Injektion zeigt, dass prinzipiell das sonographische Auflösungsvermögen für Läsionsgrößen im Millimeterbereich ausreicht [Abbildung 9]. Dennoch wurden - aufgrund dieser Ergebnisse - für die Experimente mit Tumorimplantation strenge Nachweisgrenzen gefordert (Volumen $\geq 10\mu\text{l}$ zu mindestens 3 Untersuchungen).

5.3 Diskussion der Tumorzellimplantation

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tumorzellimplantationen haben nicht zu einem sicher reproduzierbaren Tumorwachstum geführt, und die Tumoren haben kein Volumen erreicht, dass die Injektion von 6-Methyl-Purin erlaubt hätte. Hierzu wäre mindestens eine Tumorgröße von 27 μ l (Kantenlänge von 3 mm) zu fordern, um die stereotaktisch applizierte Menge von 5 μ l 6-Methyl-Purinlösung sicher zu verabreichen. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls über Schwierigkeiten berichten, im C6-Modell ein verlässliches Tumorwachstum zu erreichen [39,40]. Erklärungsansätze hierfür sind vor allem in der Immunantwort des Wistar-Tiermodells zu suchen, da es sich um einen Auszuchtstamm handelt und hierdurch die C6 Zellen – eventuell verstärkt durch das Fremdgen LacZ – vom Immunsystem als fremd erkannt werden können [1]. In dieser Arbeit musste allerdings der geplante Tierversuch aufgrund der mangelnden Verlässlichkeit des Modells vor Beginn der therapeutischen Experimente abgebrochen werden.

Die ultrasonographische Wachstumskontrolle hat sich hierbei bewährt. Ein lediglich als postmortem Analyse durchgeführter histologischer Tumorgrößenvergleich zur Bestimmung des therapeutischen Ergebnisses verschiedener 6-Methyl-Purinkonzentrationen hätte mit hoher Wahrscheinlichkeit irreführende Resultate ergeben. Mit Hilfe des Ultraschalls konnte jedoch – in Analogie zum C6-Modell - nachgewiesen werden, dass auch im orthotopen C6 lacZ Wistarrattenmodell spontane Tumorregression auftritt [39], [Abbildungen 12 und 15]. Die Reaktivierung des explantierten Tumorgewebes von Tier 2RGR 200907, nachdem sonographisch die Größenregredienz nachgewiesen war, bestätigt dies, da vitale, LacZ exprimierende Zellen vorlagen.

Vor diesem Hintergrund bieten sich als Alternativen andere immunkompetente Modelle wie Fisher/9L oder F98 an, bei denen jedoch auch eine Immunogenität vorliegt [1]. Eine weitere Lösungsmöglichkeit besteht in der Verwendung immuninkompetenter Tiere, wie zum Beispiel der Rowett nude rat [19]. In diesem Modell können sowohl ratteneigene Gliomzelllinien, ratteneigene Karzinomzelllinien als Metastasenmodell, humane etablierte Gliomzelllinien oder sogar während neurochirurgischer Eingriffe gewonnene Zelllinien aus Patientenproben intracerebral appliziert werden. Aufzucht

und Pflege dieser Tiere müssen besonders unter dem Gesichtspunkt des Operationstraumas während der Kraniektomie erhöhten Ansprüchen genügen [4]. Aufgrund der Kraniektomie sind Überlebenszeitstudien im Tumormodell nur eingeschränkt durchführbar, da im Gegensatz zur Situation am geschlossenen Schädel, eine Einklemmungssymptomatik durch erhöhten Hirndruck weniger häufig zu erwarten ist [33]. Wie von anderen Arbeitsgruppen, selbst ohne Kraniektomie beobachtet, kann es zu exophytem Wachstum mit Vorwölbung der Dura nach außen und subarachnoidaler, subduraler oder sogar subkutaner Invasion kommen [8]. Dieser Nachteil wird jedoch durch die Möglichkeit der engmaschigen ultrasonographischen Tumolvolumenbestimmung aufgewogen, die Größenveränderungen im Millimeterbereich darstellt. Darüber hinaus können mittels Power- und Dopplermode Aussagen über das Voranschreiten der Tumovaskularisation getroffen werden [Abbildung 16]. In Zukunft könnte durch die Entwicklung gelabelter Ultraschallkontrastmittel die ultrasonographische Beurteilung der Mikrovaskularisierung möglich werden [41].

5.4 Diskussion der Ultraschallergebnisse

Die ultrasonographische Untersuchung von Rattengehirn und Gefäßsystem hat sich als schnell durchführbare, kurzfristig wiederholbare und für die Tiere wenig belastende Methode erwiesen. Die Läsionsgröße lässt sich mit einem Auflösungsvermögen von 0,2 mm bestimmen. Im Vergleich zum Kernspintomogramm ist die Untersuchung weniger kostspielig und deutlich weniger zeitaufwendig, wenn auch bei der Darstellung kleinster Strukturen unterlegen [21]. Durch Hinzunahme der funktionellen Modi wie Doppler und Powermode können im Gegensatz zum Kernspintomogramm gezielt einzelne Gefäße dargestellt und in ihrer Reagibilität untersucht werden [38].

Die Tatsache, dass bei den 6-Methyl-Purin Injektionen eine Läsion des histologischen Volumens 2,69 μ l sonographisch nicht sichtbar gemacht wurde, unterstützt die im Ergebnisteil festgelegte Folgerung, dass zur Definition eines Tumorstadiums eine gewisse Kantenlänge der Raumforderung vorliegen muss. Diese sollte größer als die dritte Wurzel aus dem obigen Volumen 2,69 μ l sein, also mindestens 1,4 mm betragen. Da Umgebungsödem oder periläsionelle Hämorrhagien wie in Tier 3 (bei 500 μ l) ein sonographisches Volumen bis zu 10 μ l simulieren können, wurde dieser Wert als Tumormindestgröße definiert, also eine Kantenlänge größer als 2,1 mm. Um der Fehlinterpretation aufgrund einmaliger Messabweichungen vorzubeugen, sollte dieses Volumen an mindestens drei Tagen nachgewiesen werden.

Die zunächst zur anatomischen Orientierung vorgenommenen Gefäßdarstellungen der schädelbasisnahen Arterien erwiesen sich als in der Literatur in dieser Weise bisher nicht beschrieben. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit ein standardisiertes Untersuchungsprotokoll erarbeitet, das zur Beschreibung der Blutflussgeschwindigkeiten führte [15].

Die in der Zwischenzeit publizierten, vergleichbaren ultrasonographischen Veröffentlichungen arbeiten ohne Kraniektomie. Für die Arteria basilaris wurden mittels suboccipitaler Mikrosonde an 20 männlichen, adulten Wistarratten vergleichbare Werte ermittelt [18]. In einer Untersuchung der Maximalgeschwindigkeiten an 12 männlichen, adulten Sprague-Dawley Ratten wurden die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Blutflussgeschwindigkeiten für die Arteriae mediae bestätigt, während für die Arteria basilaris und die Arteriae carotides deutlich höhere Werte ermittelt wurden

[16]. In einer weiteren Studie zur Blutflussgeschwindigkeit wurden in 22 adulten, männlichen Sprague-Dawley Ratten für die Arteriae carotides, Arteriae posteriores und die Arteria basilaris mehr als doppelt so hohe Werte bestimmt, wie in der vorliegenden Arbeit [6]. Mit Hilfe dieser ultrasonographischen Techniken konnten bestehende Schlaganfallmodelle verfeinert werden [6,16].

Die Ergebnisse der ultrasonographischen Gefäßgrößenbestimmung sind – da die Grenze des lateralen Auflösungsvermögens bei 12 MHz um 0,2 mm, und die des axialen bei 0,4 mm liegt – nur in ihrem Größenverhältnis zueinander auswertbar. Unterhalb von 1mm erlaubt das Sonoline Elegra System mit Schrittweiten von 0,1 mm eine Untersuchung von Distanzen bis herab auf 0,2 mm. Dies entspricht nur noch einer semiquantitativen Bestimmung mittels 9 Stufen in diesem Größenbereich. Im Gegensatz hierzu erlaubt die kernspintomographische Untersuchung Gefäßdurchmesserbestimmungen mit einer Genauigkeit von hundertstel Millimetern, die vergleichbare Veröffentlichung findet insgesamt um die Hälfte kleinere Werte [38]. Hier liegt ein systematischer Fehler zu Ungunsten der Sonographie vor, die mittels Powermode den Durchmesser zu groß darstellt. Modernere Ultraschallgeräte erlauben das Herausrechnen bewegter Anteile aus dem Gefäßlumen, so dass in Zukunft eine genauere Bestimmung möglich wird.

Auch in der Darstellung von pathologischen Gefäßneubildungen kann das hier vorgestellte Tiermodell in Zukunft eine große Rolle spielen. So ist es gelungen neo-angiogenetische, pathologische Gefäße ultrasonographisch sowohl im Doppler-Mode, aber auch im Power-Mode darzustellen [Abbildung 16]. In zuvor erfolgten anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass genetische Manipulationen an der Expression von VEGF-Rezeptoren zum Wachstumsstopp bei Glioblastomen führte. Auch die Gabe von Anti-VEGF Antikörpern hat einen positiven Effekt auf das Langzeitüberleben von immunsupprimierten Ratten im Tiermodell [30]. Mit dem hier vorgestellten Tiermodell könnte sowohl die Neoangiogenese, als auch die Rückbildung der pathologischen Gefäße nach Medikamentengabe in Echtzeit und beliebig oft dargestellt werden.

5.5 Bewertung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit legt einen Grundstein zur zukünftigen Untersuchung neuer und experimenteller Therapien im Rattengliommodell. Die mikrochirurgische Kraniektomie erlaubt mittels Ultrasonographie Tumorgröße und Tumorvaskularisierung engmaschig zu bestimmen. Die operativen Techniken und sonographischen Untersuchungsgänge wurden verfeinert und weitgehend standardisiert, so dass zukünftige Arbeiten auf diese Methodik zurückgreifen können.

Bezüglich der einzelnen in der Problemstellung genannten Punkte wurden folgende Resultate erzielt:

1. Eine intracerebrale Applikation von bis zu $100\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ 6-Methyl-Purin kann nebenwirkungsarm und ohne Provokation von Gewebläsionen vertragen werden. Aus den in Zellkultur ermittelten tumoriziden Konzentrationen, die deutlich unter diesem Wert liegen, ergibt sich ein relativ breites therapeutisches Fenster für die potentielle Anwendung des PNP Gentherapiesystems. Die nächsten Schritte in Richtung auf ein Suizidgentherapiemodell umfassen die Entwicklung eines auf Gliomzellen ausgerichteten Genvektors zur Transfektion der im Tiermodell einzusetzenden Zelllinien.
2. Das C6 LacZ Wistarrattenmodell hat in der vorliegenden Arbeit nicht zu einer zuverlässigen oder reproduzierbaren Tumorinduktion geführt, in der Folge war es nicht möglich die vorgesehenen Experimente zur intratumoralen 6-Methyl-Purin-Injektion vorzunehmen. Als Konsequenz sollen in der nächsten Versuchsreihe immuninkompetente Rowett nude rat – Tiere eingesetzt werden. Zunächst sind Vorversuche mit Implantation verschiedener Zelllinien geplant, um eine verlässliche Tumorinduktion zu erhalten. Nach Möglichkeit sollen hierbei schon aus neurochirurgischen Operationspräparaten stammende humane Glioblastomzellen Verwendung finden. In der Folge würden therapeutische Experimente möglich.
3. Die ultrasonographische Untersuchung hat sich als schnell, zuverlässig und detailgenau erwiesen, die Darstellung cerebraler Läsionen und ihrer Wachstumstendenz ist möglich. Die gut reproduzierbaren Ergebnisse bezüglich der Blutflussgeschwindigkeit schädelbasisnaher Gehirnarterien sind zwischenzeitlich von anderen Arbeitsgruppen nachvollzogen und zur Verfeinerung von Schlaganfall-Tiermodellen verwendet worden. Die vorgesehene Nachfolgestudie zur Tumorinduktion

unter Verwendung des Nacktrattenmodells soll auch dem Abgleich zwischen kernspintomographischen und ultrasonographischen Volumenbestimmungen dienen. Die Verfeinerung der sonographischen Technik zur Gefäßdarstellung zusammen mit einer verbesserten räumlichen Auflösung wird in Zukunft bei Experimenten zur Tumorvaskularisation wie zum Beispiel mit Angiogenesehemmern hilfreich sein.

6 ZUSAMMENFASSUNG

6.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschreibt die Verfeinerung einer Kraniektomietechnik und die Standardisierung eines ultrasonographischen Untersuchungsgangs zur Beurteilung intracerebraler Läsionen, parenchymaler Raumforderungen und schädelbasisnaher Arterien im Wistarrattenmodell. Hierzu wurden drei Versuchsreihen durchgeführt.

Als Vorversuch zur experimentellen Gentherapie im PNP-System wurde der toxische Metabolit 6-Methyl-Purin intracerebral injiziert. Die entstehenden Läsionen wurden ultrasonographisch dargestellt und die so ermittelte Größe mit den Resultaten der späteren histologischen Aufarbeitung verglichen. Hieraus wurden ultrasonographische Kriterien für Größe und Reproduzierbarkeit abgeleitet, die die Annahme einer intracerebralen Läsion erlauben, und die in der nächsten Versuchsreihe zur Anwendung kamen.

In der zweiten Versuchsreihe wurde die Verlässlichkeit des orthotopen C6 LacZ Wistarrattenmodells bezüglich Tumorinduktion und Wachstum ultrasonographisch überprüft. Ein für die geplante Behandlung der Tumoren mittels 6-Methyl-Purin Injektion ausreichendes Tumorstadium konnte nicht erreicht werden. Die ultrasonographische Wachstumskontrolle ermöglichte hierbei die Darstellung der Wachstumskinetik und wies die spontane Regression der implantierten Tumoren nach.

Die dritte Versuchsreihe beschäftigte sich mit der Darstellung schädelbasisnaher cerebraler Arterien. Die Ultraschalluntersuchung lieferte gut reproduzierbare Ergebnisse für die Blutflussgeschwindigkeiten, die Gefäßdurchmesser ließen sich bis in einen Größenbereich von Zehntelmillimetern bestimmen.

Es konnte mit den hier vorliegenden Ergebnissen die Anwendbarkeit der Ultraschalldarstellung für die drei Fragestellungen gezeigt werden. Die Übertragung der hier vorgestellten Technik in ein immun-inkompetentes, orthotopes Gliommodell kann die Problematik der spontanen Tumorregression lösen, muss aber auf seine Verträglichkeit in den abwehrgeschwächten Tieren hin geprüft werden. Hiermit würde die Durchführung des 6-Methyl-Purin Therapieversuches möglich.

Die Referenzierung und statistische Aufarbeitung der bisher in der veterinärmedizinischen Literatur nicht angegebenen Blutflussgeschwindigkeiten ist

zwischenzeitlich im Rahmen einer weiteren Dissertation bearbeitet und im Journal „Neurological Research“ publiziert worden.

6.2 Summary

The present study deals with the technical refinement of the craniectomy and the standardisation of the ultrasonographic investigation of intracerebral lesions, orthotopic tumors and basal cerebral arteries in the Wistar rat model. The technique was applied in three sets of experiments.

6-methyl-purine as the toxic metabolite of the PNP-gene therapy system was injected intracerebrally. The resulting lesions were measured sonographically and the obtained sizes were compared to the post mortem histological results. Ultrasonographic criteria for size and retest frequency were defined allowing for detection of a lesion. These criteria were applied in the next experiment.

Second, an ultrasonographic monitoring of tumor growth was performed using the orthotopic C6 LacZ Wistar rat glioma model. It showed the lack of reliable tumor induction, thus the scheduled intratumoral injection experiments with 6-methyl-purine could not be performed. The growth kinetics and the spontaneous regression of the tumors were correctly detected by sonography.

In the third set of experiments, blood flow velocities and vessel diameters were examined ultrasonographically in the major cerebral vessels. Blood flow velocities were detected reliably and the limit of discrimination for vessel diameters was in the range of tenths of millimetres.

In all three experiments the ultrasonographic technique was feasible and useful. When applying this technique to an immune - incompetent nude rat model, a reliable tumor growth might be obtained, but the approach has to be checked for adverse side - effects in the immunodeficient animals.

In the meantime, a reference data set with statistical work up has been obtained for the cerebral blood vessels. Since a search of the literature did not find comparable publications the results have been published in "Neurological Research".

7 LITERATURNACHWEIS

1. Barth RF.
Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas.
J Neurooncol 36(1): 91-102, 1998
2. Bharara S, Sorscher EJ, Gillespie GY, Lindsey JR, Hong JS, Curlee KV, Allan PW, Gadi VK, Alexander SA, Secrist JA 3rd, Parker WB, Waud WR.
Antibiotic-mediated chemoprotection enhances adaptation of E. coli PNP for herpes simplex virus-based glioma therapy.
Hum Gene Ther 16(3): 339-347, 2005
3. Burger PC, Shibata T, Kleihues P.
The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology.
Am J Surg Pathol 10(9):611-617, 1986
4. Dauchy RT, Dupepe LM, Ooms TG, Dauchy EM, Hill CR, Mao L, Belancio VP, Slakey LM, Hill SM, Blask DE.
Eliminating animal facility light-at-night contamination and its effect on circadian regulation of rodent physiology, tumor growth, and metabolism: a challenge in the relocation of a cancer research laboratory.
J Am Assoc Lab Anim Sci 50(3):326-336, 2011
5. Deltour I, Auvinen A, Feychting M, Johansen C, Klæboe L, Sankila R, Schüz J.
Mobile phone use and incidence of glioma in the Nordic countries 1979-2008: consistency check.
Epidemiology 23(2): 301-307, 2012
6. Lapergue B, Deroide N, Pocard M, Michel JB, Meilhac O, Bonnin P.
Transcranial duplex sonography for monitoring circle of Willis artery occlusion in a rat embolic stroke model.
J Neurosci Methods 30; 197(2): 289-296, 2011
7. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R.
MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.
N Engl J Med 352: 997-1003, 2005
8. Hilšer M, Trylčová J, Bušek P, Sedo A.
Limitations of macroscopic fluorescence imaging for the estimation of tumour growth in an orthotopic glioma mouse model.
Folia Biol (Praha) 58(3): 128-133, 2012
9. Holodny AI, Makeyev S, Beattie BJ, Riad S, Blasberg RG.

- Apparent diffusion coefficient of glial neoplasms: correlation with fluorodeoxyglucose-positron-emission tomography and gadolinium-enhanced MR imaging.
AJNR Am J Neuroradiol 31(6): 1042-1048, 2010
10. Immonen A, Vapalahti M, Tyynela K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R, Langford G, Murray N, Yla-Herttuala S.
AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study.
Mol Ther 10(5): 967-72, 2004
 11. Jödicke A, Springer T, Böker D-K.
Real-time integration of ultrasound into neuronavigation: technical accuracy using a light-emitting-diode-based navigation system.
Acta Neurochir 146: 1211-1220, 2004
 12. Kaps M, von Reutern GM, Stolz E, von Büdingen HJ (Hrsg).
Ultraschall in der Neurologie, 2. Auflage 2005, Georg Thieme Verlag Stuttgart
 13. König JFR, Klippel RA.
The Rat Brain A Stereotaxic Atlas, The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1963
 14. Kreis AD.
Etablierung einer ultrasonographischen Untersuchungstechnik zur Bestimmung von cerebralen Blutflussgeschwindigkeiten im Tiermodell.
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, 2012
 15. Kreis D, Schulz D, Stein M, Preuss M, Nestler U.
Assessment of parameters influencing the blood flow velocities in cerebral arteries of the rat using ultrasonographic examination.
Neurological Research 33: 389-395, 2011
 16. Li L, Ke Z, Tong KY, Ying M.
Evaluation of cerebral blood flow changes in focal cerebral ischemia rats by using transcranial Doppler ultrasonography.
Ultrasound Med Biol 36: 595-603, 2010
 17. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (Eds).
WHO Classification of tumours of the central nervous system, 4th edition
IARC, Lyon 2007
 18. Matsievskiy DD, Konorova IL, Lebedeva MA.
Transcranial Evaluation of Blood Flow Velocity in the Basilar Artery in Rats by High Frequency Ultrasonic Doppler Technique.
Bull Exp Biol Med 148: 568-571, 2009

19. Miura FK, Alves MJ, Rocha MC, da Silva R, Oba-Shinjo SM, Marie SK.
Xenograft transplantation of human malignant astrocytoma cells into immunodeficient rats: an experimental model of glioblastoma.
Clinics 65(3): 305-309, 2010
20. Montgomery JA, Hewson K.
Analogues of 6-methyl-9-beta-D-ribofuranosylpurine.
J Medicinal Chemistry 11(1): 48-52, 1968
21. Mook OR, Jonker A, Strang AC, Veltien A, Gambarota G, Frederiks WM, Heerschap A, Van Noorden CJ.
Noninvasive magnetic resonance imaging of the development of individual colon cancer tumors in rat liver.
Biotechniques 44(4): 529-535, 2008
22. Nestler U, Heinkelein M, Lücke M, Meixensberger J, Scheurlen W, Kretschmer A, Rethwilm A.
Foamy virus vectors for suicide gene therapy.
Gene Therapy 4 (11): 1270-7, 1997
23. Nestler U, Rollnik S, Schulz C, Chakraborty T, Domann E, Hain T.
Expression of the reporter genes lacZ and EGFP in human glioblastoma cells using *Listeria monocytogenes* as vector for gene transfer.
Neurological Research 31(8): 859-868, 2009
24. Nestler U, Schulz D, Wanis FA, Zuehlke C, Schaenzer A, Christophis P.
Recurrent Giant Cell Glioblastoma with the Neuroradiologic Picture of Multiple Meningiomas.
J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg 74(2): 116-119, 2013
25. Nestler U, Winking M, Böker D-K.
The tissue level of dexamethasone in human brain tumors is about 1000 times lower than the cytotoxic concentration in cell culture.
Neurological Research 24 (5): 479-82, 2002
26. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P.
Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study.
Cancer Res 1;64(19): 6892-6899, 2004
27. Ostertag D, Amundson KK, Lopez Espinoza F, Martin B, Buckley T, Galvão da Silva AP, Lin AH, Valenta DT, Perez OD, Ibañez CE, Chen CI, Pettersson PL, Burnett R, Daublebsky V, Hlavaty J, Gunzburg W, Kasahara N, Gruber HE, Jolly DJ, Robbins JM.
Brain tumor eradication and prolonged survival from intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil using a nonlytic retroviral replicating vector.
Neuro Oncol 14(2): 145-159, 2012

28. Rainov NG, Koch S, Sena-Esteves M, Berens ME.
Characterization of a canine glioma cell line as related to established experimental brain tumor models.
J Neuropathol Exp Neurol 59(7): 607-613, 2000
29. Ram Z, Culver KW, Oshiro EM, Viola JJ, DeVroom HL, Otto E, Long Z, Chiang Y, McGarrity GJ, Muul LM, Katz D, Blaese RM, Oldfield EH.
Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells.
Nat Med 3(12):1354-1361, 1997
30. Rubenstein JL, Kim J, Ozawa T, Zhang M, Westphal M, Deen DF, Shuman MA.
Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption.
Neoplasia 2(4): 306-314, 2000
31. Salvati M, D'Elia A, Melone GA, Brogna C, Frati A, Raco A, Delfini R.
Radio-induced gliomas: 20-year experience and critical review of the pathology.
J Neurooncol 89(2): 169-177, 2008
32. Schulz G, Crooijmans HJ, Germann M, Scheffler K, Müller-Gerbl M, Müller B.
Three-dimensional strain fields in human brain resulting from formalin fixation.
J Neurosci Methods 202(1):17-27, 2011
33. Simard JM, Tsymbalyuk N, Tsymbalyuk O, Ivanova S, Yurovsky V, Gerzanich V.
Glibenclamide is superior to decompressive craniectomy in a rat model of malignant stroke.
Stroke 41(3): 531-537, 2010
34. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ.
ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial.
Lancet Oncol 7(5): 392-401, 2006
35. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group.
Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.
N Engl J Med 352(10): 987-996, 2005
36. Tabatabai G, Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME, Tonn JC, Wick W, Weller M.
Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective.

Acta Neuropathol 120(5): 585-592, 2010

37. Uhl E, Zausinger S, Morhard D, Heigl T, Scheder B, Rachinger W, Schichor C, Tonn JC.
Intraoperative computed tomography with integrated navigation system in a multidisciplinary operating suite.
Neurosurgery 64(5): 231-239, 2009
38. van den Bergh WM, Schepers J, Veldhuis WB, Nicolay K, Tulleken CA, Rinkel GJ.
Magnetic resonance imaging in experimental subarachnoid haemorrhage.
Acta Neurochir (Wien) 147(9): 977-983, 2005
39. Vince GH, Bendszus M, Schweitzer T, Goldbrunner RH, Hildebrandt S, Tilgner J, Klein R, Solymosi L, Tonn JC, Roosen K.
Spontaneous regression of experimental gliomas--an immunohistochemical and MRI study of the C6 glioma spheroid implantation model.
Exp Neurol 190(2): 478-485, 2004
40. Watanabe K, Sakamoto M, Somiya M, Amin MR, Kamitani H, Watanabe T.
Feasibility and limitations of the rat model by C6 gliomas implanted at the subcutaneous region.
Neurol Res 24(5): 485-490, 2002
41. Willmann JK, Paulmurugan R, Chen K, Gheysens O, Rodriguez-Porcel M, Lutz AM, Chen IY, Chen X, Gambhir SS.
US imaging of tumor angiogenesis with microbubbles targeted to vascular endothelial growth factor receptor type 2 in mice.
Radiology 246(2): 508-518, 2008
42. Yoshikawa K, Kajiwara K, Morioka J, Fujii M, Tanaka N, Fujisawa H, Kato S, Nomura S, Suzuki M.
Improvement of functional outcome after radical surgery in glioblastoma patients: the efficacy of a navigation guided fence-post procedure and neurophysiological monitoring.
J Neurooncol 78(1): 91-7, 2006

8 ANHANG

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1

Genetische Veränderungen in Glioblastomen

7

Tabelle 2

Vergleich zwischen ultrasonographischer und histologischer Läsionsgrößenbestimmung

37

Tabelle 3

Ultrasonographisch ermittelte Blutflussgeschwindigkeiten und Gefäßdurchmesser

43

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1

Histologische Aufarbeitung eines Glioblastoms

6

Abbildung 2

Ultrasonographische Darstellung im B-Mode

11

Abbildung 3

Ultrasonographische Darstellung im C-Mode

12

Abbildung 4

Ultrasonographische Darstellung im Dopplermode

13

Abbildung 5

Ultrasonographische Darstellung im Powermode

14

Abbildung 6

Chemische Formeldarstellung von 6-Methyl-Purin

16

Abbildung 7

Purinnucleosidphosphorylase/6-Methylpurindesoxyribosid Modell

17

Abbildung 8

Intraoperativer Blick auf die freigelegte Hirnoberfläche

25

Abbildung 9

Darstellung des Stichkanals nach stereotaktischer Injektion

27

Abbildung 10 <i>Experimentelles Protokoll Methylpurininjektion</i>	27
Abbildung 11 <i>Dreidimensionale Rekonstruktion des Rattenschädels mittels hoch auflösendem volumetrischem Computertomogramm</i>	36
Abbildung 12 <i>Darstellung der kriterienerfüllenden, ultrasonographisch gemessenen Tumervolumina</i>	39
Abbildung 13 <i>Ultrasonographische Darstellung eines Tumors im coronaren Schnittbild</i>	40
Abbildung 14 <i>Histologische Darstellung eines explantierten Tumors</i>	40
Abbildung 15 <i>Darstellung der nicht kriterienerfüllenden, ultrasonographisch gemessenen Tumervolumina</i>	41
Abbildung 16 <i>Power-Mode Darstellung eines pathologischen, neo-angiogenetischen, tumorinduzierten Zerebralfäßes</i>	42

8.3 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Staufenberg, den 04.03.2013

Dirk Schulz

Teile der vorliegenden Arbeit gelangten bereits zur Veröffentlichung in:

Nestler U, Schulz D, Mielke D, Joedicke A, Boeker D-K.

Determination of blood flow velocities in cerebral arteries of the rat using triplex mode Doppler ultrasonographic examination.

Poster auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie, Bad Nauheim, 2006

Klin Neurophysiol 37 (1): P159, 2006

Nestler U, Kreis D, Schulz D, Stein M, Böker D-K.

Independence of basilar blood flow velocity from carotid blood flow in an ultrasonographic rat model.

Vortrag auf der Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie, Münster 2010

Kreis D, Schulz D, Stein M, Preuss M, Nestler U

Assessment of parameters influencing the blood flow velocities in cerebral arteries of the rat using ultrasonographic examination

Neurological Research, Volume 33, Number 4, May 2011 , pp. 389-395

8.4 Danksagung

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2005 bis Januar 2008. Die Experimente wurden in labortechnischen Abteilungen am Institut für Physiologie und an der Neurochirurgischen Klinik durchgeführt.

Dem ehemaligen Direktor Herrn Prof. Dr. med. Böker, gilt mein Dank für das Anvertrauen des Themas sowie für die Bereitstellung von Laborplätzen und Arbeitsmaterialien.

Herrn PD Dr. med. Ulf Nestler gilt mein besonderer Dank für die ausführliche wissenschaftliche Betreuung sowie die Einarbeitung in korrekte, operative, mikrochirurgische Verfahren. Ohne seinen Überblick über das Gesamtkonzept wären klinische Aspekte nur schwerlich in die Arbeit eingeflossen.

Er war der Diskussion spezieller und auch allgemeiner Fragen nie abgeneigt. Hierbei war sein Verhalten stets von konstruktiv-kritischem Charakter geprägt.

Besonders möchte ich auch Frau Hof und Frau Kierok, den Medizinisch Technischen Assistentinnen aus dem Liquorlabor danken, die immer dafür sorgten, dass ich mit Zellen zum Implantieren von Tumoren versorgt war. Auch ihre Hilfe bei der Herstellung von histologischen Präparaten war von unschätzbarem Wert.

Vielen Dank auch an Prof. Noll und den Tierpflegern aus der Physiologie, die es erst ermöglichten, die benötigten Tiere für die Versuche unterzubringen und zu operieren.

Für die stets tatkräftige Unterstützung und Motivation möchte ich meiner Frau, meiner Familie, Frau Dr. med. Annette Dorothee Kreis und meinen Freunden danken, ohne die diese Doktorarbeit niemals möglich geworden wäre.

Allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der neurochirurgischen Klinik sei für die freundliche und zuvorkommende Behandlung Dank gesagt.