

**Aus dem
Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Institut für Radiologie
Charité-Universitätsmedizin
Campus Mitte**

**Magnetresonanztomographische Untersuchung
verschiedener Eisenoxidnanopartikel bezüglich ihrer
Anreicherung am Glioblastom-Modell der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Romina Turco
Tierärztin aus Kassel

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3354

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Plendl
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. B. Hamm
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Tönhardt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats; brain; neoplasms; iron oxides; magnetic resonance imaging;
contrast media

Tag der Promotion: 13.07.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-820-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

INHALTSVERZEICHNIS

1	Verwendete Abkürzungen	4
2	Einleitung und Zielsetzung	6
3	Literaturübersicht.....	8
3.1	Einführung.....	8
3.2	Glioblastoma multiforme (Grad IV)	9
3.2.1	Histologie und Lokalisation.....	10
3.2.2	Ätiologie	10
3.2.3	Klinik	11
3.2.4	Diagnosestellung.....	11
3.2.5	Therapie.....	13
3.2.5.1	Strahlentherapie.....	14
3.2.5.2	Chemotherapie.....	14
3.2.5.3	Experimentelle Therapieansätze	17
3.2.5.4	Geneherapie	18
3.2.5.5	Anti-Angiogenese.....	19
3.2.5.6	Stammzellforschung.....	20
3.2.5.7	Tierexperimentelle Studien.....	20
3.3	Glioblastome bei Hund und Katze	20
3.4	Experimentelle Glioblastom-Modelle	21
3.5	MRT	22
3.5.1	Grundlagen	23
3.5.2	Voraussetzung für die MRT	23
3.5.3	Relaxation	24
3.5.4	Signalintensität und Bildkontrast	24
3.5.5	Sequenzen.....	25
3.6	Kontrastmittel in der MRT	26
3.6.1	Einleitung	26
3.6.2	Wirkungsweise der Kontrastmittel	28
3.6.2.1	Paramagnetismus	29
3.6.2.2	Superparamagnetismus	30
3.6.3	Superparamagnetische Eisenoxidpartikel (SPIO) als Kontrastmittel für die MR- Tomographie	30
3.6.3.1	Relaxationsverstärkende Eigenschaften.....	31
3.7	Verwendete Kontrastmittel	32
3.7.1	VSOP-C	32

3.7.2	VSOP-DOXO	33
3.7.3	Resovist S®	34
3.7.4	VSOP-Protamin.....	34
4	Material und Methoden.....	35
4.1	Tumorzellen	35
4.1.1	Kulturbedingungen	35
4.1.2	Zellzahlbestimmung	35
4.1.3	Passagieren der Zellen	35
4.1.4	Langzeitlagerung und Kryokonservierung der Tumorzellen	36
4.1.5	Präparation der Zellen für die Implantation	36
4.1.6	Untersuchte Tiere.....	36
4.1.7	Haltung der Tiere	37
4.1.8	Implantation der Tumorzellen	37
4.2	Verwendete Kontrastmittel	40
4.3	Versuchsablauf	41
4.3.1	Narkose.....	41
4.3.2	Untersuchungstechnik.....	42
4.3.3	Positionierung der Ratten.....	42
4.3.4	Wahl der Messequenz.....	42
4.4	Applikation der Kontrastmittel.....	42
4.4.1	Intraarterielle Applikation.....	42
4.4.2	Intrazisternale Applikation	43
4.5	Auswertung der MRT-Messungen.....	43
4.6	Histologische Untersuchungen	44
4.6.1	Entnahme des Gehirns und Vorbereitung für die histologische Untersuchung.....	44
4.6.2	Histologische Färbungen.....	45
4.6.2.1	Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	46
4.6.2.2	Auswertung der Berliner-Blau-Färbung	46
4.7	Statistische Auswertung	48
5	Ergebnisse	49
5.1	Tumorbildung	49
5.2	MRT-Untersuchungen	49
5.2.1	Morphologische MRT	49
5.2.2	MRT mit VSOP.....	51
5.2.2.1	Intraarterielle Applikation.....	52
5.2.2.2	Intrazisternale Applikation	54
5.2.3	Vergleich der Gruppen zu den 5 Messpunkten.....	58

5.3	Histologische Untersuchungen.....	63
5.3.1	Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	63
5.3.2	Auswertung der Berliner-Blau-Färbung zur Eisenlokalisation	64
6	Diskussion.....	70
6.1	Tumormodell	70
6.2	Morphologische MRT	71
6.3	MRT- Messungen nach Applikation der superparamagnetischen Eisenoxide.....	71
6.4	Histologische Auswertung der Präparate.....	76
7	Zusammenfassung.....	78
8	Summary.....	80
9	Literaturverzeichnis	82
10	Anhang.....	102
11	Danksagung	111
12	Selbstständigkeitserklärung.....	112

1 Verwendete Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABC-Protein	ATP-Binding Cassette-Protein
ACNU	Nimustin (Zytostatikum)
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
BCNU	Carmustin (Zytostatikum)
CCNU	Lomustin (Zytostatikum)
cm ²	Quadratzenimeter
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNS	Desoxyribunukleinsäure
DOXO	Doxorubicin
EDTA	Ethylendiamin Tetraacid
FBS	Fetales Bovines Serum
FLT	Fluoro-L-Thymidin
FLASH	fast low angle shot
FOV	Field of view
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GBM	Glioblastoma multiforme
Gd	Gadolinium
GRE	Gradientenecho
GS-9L	Glioblastom Zelllinie
h	Stunde
H1	Humanes Parvovirus
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HF	Hochfrequenz
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV-TK	Herpes-Simplex-Virus Tyrosinkinase
i.a.	intraarteriell
i.m.	intramuskulär
i.z.	intrazisternal
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
Lsg.	Lösung
MDR	Multi-Drug-Resistenzprotein
MDT	Magnetische Drug Targeting
mg	Milligramm
MGMT	Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
MPS	Mononukleäres Phagozyten System
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde/-n
NS-1	Influenza A Virus
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCB	Procarbacin
PCV	Procarbacin, Lomustin, Vincristin (Zytostatika)
PD	Protonen-Dichte
pH	pondus hydrogenii
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
R1	T1-Relaxivität
R2	T2-Relaxivität
RG	Rattengliom-Modell
ROI	region of interest
s.	siehe
S.	Seite
s.c.	subkutan
SE	Spinecho
SI	Signalintensität
SNR	signal-to-noise-ratio (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computer-Tomographie
SPIO	superparamagnetic iron oxide
T	Tesla
T1	Longitudinale (Spin-Gitter) Relaxationszeit
T2	Transversale (Spin-Gitter) Relaxationszeit
Tab.	Tabelle
TE	time to echo (Echozeit)
TR	Time to repetition, inversion time (Inversionszeit)
USPIO	ultra small particles of iron oxide
VEGF	vascular endothelial growth factor
VM 26	Teniposid (Topoisomerase-Hemmer)
VP 16	Etiposid (Topoisomerase-Hemmer)
VSOP	very small iron oxide particles
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol

2 Einleitung und Zielsetzung

Gehirntumore des Menschen treten vergleichsweise selten auf, und ihr Anteil ist mit insgesamt ca. 2% aller Krebserkrankungen eher gering (Schlegl und Wiestler 2001). Das Glioblastom stellt dabei den häufigsten und bösartigsten astrozytären Tumor dar. Zusammen mit allen Neoplasien des Gehirns ist das Glioblastom dennoch, neben dem Schlaganfall, die zweithäufigste durch intrakranielle Erkrankung bedingte Todesursache (Poeck und Hacke 2001). Seine Entstehung ist auf die proliferative Entartung von Gliazellen zurückzuführen. Das invasive Wachstum, die genotypische Heterogenität sowie die eingeschränkte Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit von Chemotherapeutika und die schwache körpereigene Immunantwort des Patienten beeinträchtigen die gängigen Therapiemöglichkeiten. Nach Diagnosestellung liegt die mittlere Überlebenszeit trotz multimodaler Therapie, bestehend aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie, bei weniger als einem Jahr. Lediglich 3% der Patienten überleben das fünfte Jahr (Ohgaki und Kleihues 2005). In Anbetracht der begrenzten Wirksamkeit herkömmlicher Therapieansätze und der infausten Prognose der Erkrankung ist die Erforschung neuer Therapieansätze von besonderer Wichtigkeit.

Die Forschung beschäftigt sich daher auf vielen Gebieten intensiv mit der Etablierung neuer Strategien. Dazu zählen die Gen- und Immuntherapie, die antiangiogenetische Therapie sowie die Immunotoxintherapie. Als ein weiteres einheitliches Forschungsgebiet gilt das magnetische Drug Targeting (MDT), ein neues Therapieverfahren auf dem Gebiet der lokalen Chemotherapie (Barry 2008). Dabei werden mit Wirkstoff beladene magnetische Partikel durch das Anlegen eines magnetischen Feldgradienten zum Tumor hin bewegt und dort gehalten (Pulfer et al. 1999; Maier-Hauff et al. 2007; Jordan et al. 2007). Insgesamt waren im Oktober 2008 allein bei Clinicaltrials.gov, einem Register der United States National Library of Medicine, 198 klinische Studien zum Glioblastom als aktiv oder in Vorbereitung registriert.

Ein ebenfalls neuer Ansatzpunkt für eine alternative therapeutische Strategie könnte diesbezüglich die gezielte Anreicherung von Therapeutika im Tumorgewebe sein. Pulfer et al. (1999) konnten zeigen, dass sich in einem Rattengliom-Modell (RG-2) Eisenoxidpartikel stark anreicherten. Durch das Anlegen eines magnetischen Feldes konnte die Anreicherung der Partikel noch erhöht werden. Da in den Endothelien von Tumoren vermehrt negative Ladungen auftreten (Eichhorn et al., 2004; Jallouli et al., 2007; Dabbas et al., 2008; Campell et al., 2009), sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob sich mit ladungsstabilisierten superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln eine noch deutlichere Anreicherung in einem Glioblastom-Modell erreichen lässt. Aus nicht veröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe Taupitz war bekannt, dass sich das Anreicherungsverhalten im Tumor von unterschiedlich geladenen Partikeln voneinander unterscheidet. Ziel dieser Arbeit ist es daher, ein Partikelsystem zu

finden, welches sich nach intrazisternaler sowie intraarterieller Applikation im experimentellen Glioblastom der Ratte anreichert. Die Anreicherung der superparamagnetischen Eisenoxidpartikel sollte mittels eines Magnetresonanztomographen dargestellt werden. Dabei sollten sowohl negativ als auch positiv geladene Partikel miteinander verglichen werden. Es handelt sich bei den Partikeln um eine neue Substanzklasse, zu der bisher noch keine Untersuchungen bezüglich ihres Anreicherungsverhaltens in Gehirntumoren bekannt sind.

3 Literaturübersicht

3.1 Einführung

Bei den malignen Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS) unterscheidet man zwischen primären und sekundären Gehirntumoren. Primäre Neoplasien entstehen aus Zellen des ZNS, dagegen sind sekundäre Tumoren in das ZNS metastasierte Tumoren. Sie gehen von nicht hirneigenen Tumoren aus und kommen häufiger vor als primäre Gehirntumore (Goetz 2003). Unter den hirneigenen Tumoren sind die Gliome am häufigsten (Masuhr und Neumann 2007).

Die Geschichte der Klassifikation von Gehirntumoren nimmt ihren Ursprung in der Mitte des 19. Jahrhunderts mit der Arbeit von Rudolph Virchow. In „Die krankhaften Geschwülste“ (Virchow 1864-1865) definierte er die Neuroglia als Gewebsbestandteil des ZNS und setzte für die Geschwülste, die aus dieser „interstitiellen Substanz“ hervorgingen, die Bezeichnung Gliome durch. Unter den primären Tumoren des Gehirns stellt das Glioblastoma multiforme (GBM) die häufigste und gleichzeitig auch die bösartigste Variante dar. Nach der 2007 neu überarbeiteten Klassifizierung der World Health Organisation (WHO) entspricht das GBM einem astrozytären Gliom Grad IV (Louis et al. 2007). Die Hirntumore werden den Zelltypen zugeordnet, aus denen sie entstehen. Darüber hinaus erfolgt eine histopathologische Graduierung zwischen WHO I (benigne) und WHO Grad IV (maligne). Anders als bei den Astrozytomen oder den Oligodendrogliomen ist bei einem Glioblastom eine eindeutige Zuordnung zu einer Zellart der Neuroglia nicht immer möglich (Masuhr und Neuman 2007). Als histologische Varianten nennt die WHO das Riesenzell-Glioblastom und das Gliosarkom.

Die morphologischen Merkmale, welche auf ein schnelles Größenwachstum des Tumors hinweisen, spielen bei der Einschätzung der Malignität eine entscheidende Rolle. Hierzu zählen die Anzahl der Nekrosen, die endotheliale Proliferation, die Zelldichte und die Anwesenheit von zentralen Gewebnekrosen. Die Infiltrationsmerkmale des Tumors geben Hinweise auf die Erfolgsaussichten einer kompletten Resektionsoperation (Giese und Westphal 2001). Die Prognose für den einzelnen Patienten bedarf zusätzlich der Berücksichtigung biologischer Merkmale wie Alter und Allgemeinzustand, aber auch die Lokalisation des Tumors und damit seine mögliche Beeinträchtigung lebenswichtiger Hirnstrukturen spielen eine große Rolle (Buckner 2003).

Die Anzahl auftretender Krebserkrankungen auf bundesdeutscher Ebene kann bisher nur geschätzt werden, da keine vollzählige, flächendeckende Krebsregistrierung besteht (Robert Koch Institut 2002). Die Inzidenz von Gliomen wird mit 15 Neuerkrankungen pro 100.000

Einwohner im Jahr geschätzt. Sie machen etwa 30-50% der hirneigenen Tumoren aus (Zülich 1986, Poeck und Hacke 2001). Etwa 50% der Gliome sind Glioblastome (WHO Grad IV). Astrozytome (WHO Grad I-III) machen etwa 25% aus und Oligodendrogliome weniger als 5%. Ependymome werden mit einer Häufigkeit von 2-9% angegeben (Syed et al. 2007). In den USA werden für das Jahr 2008 von insgesamt 1,4 Mio. Neuerkrankungen ca. 2000 Tumoren des ZNS erwartet (Jemal et al. 2008).

3.2 Glioblastoma multiforme (Grad IV)

Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste und bösartigste hirneigene Tumor und macht etwa 80% aller Astrozytome aus (Kleihues et al. 2002). Er kann als primäres Glioblastoma multiforme (GBM) entstehen oder durch sekundäre Malignisierung aus einem Tumor niedrigeren Malignitätsgrad hervorgehen. Obwohl primäre und sekundäre Glioblastome histologisch nicht unterscheidbar sind, zeigen sie differierende genetische Alterationen und kommen in verschiedenen Altersklassen vor. Das mittlere Erkrankungsalter für Patienten mit einem primären Glioblastom liegt bei 53 Jahren (Bruce et al. 2005). Bei sekundären Glioblastomen hingegen sind die Patienten im Durchschnitt 10 bis 15 Jahre jünger. Diese Erkenntnisse lassen verschiedene molekulargenetische Entwicklungswege vermuten (Kleihues et al. 2002). Die Prognose maligner Gliome insbesondere der Glioblastome ist in der Regel infaust und hat sich in den letzten 30 Jahren trotz der Fortschritte in Diagnostik und Therapie nicht verändert (Salcman 2001).

Die Histiogenese der Gliome nimmt ihren Ursprung in den Gliazellen. Die Gliazelle ist eine strukturell und funktionell von den Neuronen abgrenzbare Zelle, fortsatzreich und elektrophysiologisch nicht erregbar. Im ZNS der Säugetiere überwiegt bei Weitem die Anzahl der Gliazellen die der Neurone. So sind über 90% der Zellen im Gehirn des Menschen Gliazellen. Zu den Gliazellen gehören verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen physiologischen Aufgaben im ZNS. Astrozyten übernehmen Stütz-, Halte- und Ernährungsfunktionen, die Mikrogliazellen sind als ortsständige Makrophagen für die immunologische Überwachung zuständig, Zellen der Oligodendroglia bilden die Markscheiden im zentralen Nervensystem und Schwannsche Zellen um je ein peripheres Axon (Deitmer et al. 1999). Die Epithelauskleidung der Ventrikel und des Zentralkanals wird von den Ependymzellen gebildet. Astrozyten sind neben den Endothelzellen die Zellen des ZNS, die unter physiologischen Umständen zur Proliferation befähigt sind. Arbeiten aus jüngster Zeit weisen daraufhin, dass auch andere nicht neoplastisch entartete Zelltypen des ZNS, vor allem Neurone, zur Neogenese befähigt sind (Yamashita et al. 2006).

3.2.1 Histologie und Lokalisation

Das feingewebliche Bild des Glioblastoma multiforme kann außerordentlich variieren und ist in der Regel durch eine markante Zell- und Kernpleomorphie gekennzeichnet. Weitere Charakteristika sind hohe Zelldichte, gesteigerte Mitoserate mit Auftreten atypischer Mitosen und Nekrosen im Tumorgewebe (Kleihues und Sobin 2000). Zudem zeigt das histologische Bild mikrovaskuläre Proliferation als Ausdruck der ausgeprägten Angiogenese. Die Vaskularisierungsdichte und Morphologie der Tumorgefäße sind wichtige Malignitätskriterien bei der Abgrenzung zwischen Gliomen Grad III und IV. So dient die Blut-Hirn-Schranke (BHS), die sich aus Kapillarendothel, Basalmembran und Oberflächenmembran der Astrozytenausläufer zusammensetzt, in physiologischer Weise als Stoffbarriere. Sie kann passiv nur von niedermolekularen lipophilen Substanzen passiert werden. Im Verlauf einer Tumorerkrankung kann es zu einer erhöhten Permeabilität der BHS und in Folge dessen zur Ödembildung kommen (Liebner et al. 2000). Die mit dem GBM neu gebildeten Blutgefäße weisen Strukturveränderungen auf, die mit einer Störung der BHS einhergehen (Neuhaus 1990). In diesem Fall kann Serum einschließlich seiner kolloidalen und gelösten Bestandteile über den Tumor in den extrazellulären Raum des ihn umgebenden Gewebes eindringen und dort den Wassergehalt drastisch erhöhen. Diese durch eine Zunahme des extrazellulären Wassers bedingte Gewebsschwellung in der Umgebung des Tumors wird als perifokales Ödem bezeichnet. In der Kernspintomographie zeigt sich eine ringförmige Kontrastmittelanreicherung, resultierend aus der Blut-Hirn-Schrankenstörung (Wolburg 1995).

Das Glioblastoma multiforme geht von der weißen Substanz aus. Seine mit Abstand häufigste Lokalisation ist das Großhirn, wo es in allen Hirnlappen entstehen kann. Seltener sind Glioblastome des Balkens, im Zwischenhirn oder im Hirnstamm. Im Bereich von Kleinhirn und Rückenmark kommen Glioblastome seltener vor. Das Wachstum ist diffus infiltrierend. Oft wachsen hemisphärielle Glioblastome über den Balken auf die andere Seite hinüber. Solche Tumoren werden als so genannte „Schmetterlingsgliome“ bezeichnet (Steltzer et al. 1997).

3.2.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Glioblastoma multiforme (GBM) ist wie bei den meisten anderen Hirntumoren weitgehend unbekannt. Der Tumor kann als primäres Glioblastoma multiforme entstehen oder durch sekundäre Malignisierung aus einer Neoplasie niedrigeren Malignitätsgrades hervorgehen. Die Mehrzahl der Gliome entsteht sporadisch. Eine Häufung maligner Gliome wird in Familien mit hereditären Tumorsyndromen wie dem Li-Fraumeni- und dem Tucco-Syndrom gesehen (Collins et. al. 2004). Hereditäre Tumorsyndrome umfassen eine heterogene Grup-

pe von Erkrankungen, die sich durch eine genetisch bedingte Prädisposition für benigne und maligne Neoplasien in unterschiedlichen Organen auszeichnet. Auf molekulargenetischer Ebene konnte ein Allelverlust auf Chromosom 10 nachgewiesen werden, welcher bei ca. 75% aller Glioblastome auftritt. Sowohl beim GBM als auch bei Astrozytomen WHO-Grad I und II finden sich oftmals zusätzlich Allelverluste auf den Chromosomen 17p, 19q, 22q, 9p und eine Mutation des p53-Gens (von Deimling et al. 1992; Kleihues et al. 1995; Fulci et al. 2000). Diese genetischen Veränderungen führen zu einer Deletion oder Mutation von Tumorsuppressorgenen und bedingen somit das Wachstum des Tumors. Auch gibt es Hinweise dafür, dass die Genotypisierung bei der Abschätzung der Prognose hilfreich sein kann (Schmidt et al. 2002). Bislang hat sich keine exogene Noxe als eindeutiger Risikofaktor für die Entstehung maligner Hirntumore beim Menschen erwiesen. Die einzig bekannte Ausnahme stellt die therapeutische Röntgenbestrahlung des Schädels im Kindesalter bei der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie dar (Neglia et al. 1991). Über einen onkogenen Effekt elektromagnetischer Strahlung durch Mobiltelefone auf das Gehirn wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen veröffentlicht. Neuere Studien belegen allerdings, dass das Telefonieren mit dem Handy nicht das Risiko erhöht, an einem Hirntumor zu erkranken (Rubin et al. 2006; Ahlbom et al. 2007). Auch für andere Umweltfaktoren konnte bislang kein onkogener Effekt nachgewiesen werden (Salcman 2001).

3.2.3 Klinik

Aufgrund des schnellen Tumorwachstums haben Patienten mit einem malignen Gliom in der Regel eine kurze Anamnese mit ausgeprägten Hirndruckzeichen. Kopfschmerzen und Hemiparesen sind die häufigsten Symptome, gefolgt von Krampfanfällen, mentalen Veränderungen, Lähmungserscheinungen, Sprachstörungen sowie Papillenödem. Die Befunde sind abhängig von der jeweiligen Lage, Größe und dem biologischen Verhalten des Tumors (Parney 2000). Die Diagnose wird im Durchschnitt 1-6 Monate nach Einsetzen der ersten Symptome gestellt (Bruce et al. 2005).

3.2.4 Diagnosestellung

In der Diagnostik von Hirntumoren sind die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) die wichtigsten Untersuchungsverfahren. Die MRT kann aufgrund ihres hohen Weichteilkontrastes anatomische Details besser darstellen als die CT. Außerdem ist die Schnittführung beliebig wählbar, und die Auflösungsfähigkeit und geringere Artefaktanfälligkeit bei schädelbasisnahen Prozessen sind deutlich besser. Daher wird die MRT

bei entsprechenden Fragestellungen bevorzugt eingesetzt (Bragg und Osborn 1991, Byrne 1994). Auch lassen sich Gliome z.T. schon in einem frühen Stadium mit einer hohen Präzision erfassen. In der MRT führen Gliome typischerweise zu einer Verlängerung der T1- und der T2- Relaxationszeit und erscheinen so hypointens in T1-gewichteten, hyperintens in T2-gewichteten und meist ganz gering hyperintens in Protonen-Dichte (PD)-gewichteten Sequenzen. Nach Kontrastmittelgabe lassen sich solide, zystische und nekrotische Tumorteile von einem perifokalen Ödem abgrenzen. Die genaue Darstellung der soliden Tumorgrenze ist jedoch nicht möglich. Es finden sich auch außerhalb der im T2-gewichteten Bild dargestellten Invasionszone vereinzelt Tumorzellen, welche der diagnostischen Bildgebung entgehen (Giese und Westphal 2001).

Trotz großen Fortschritts, insbesondere durch die Einführung der MRT, sind einige Aspekte in der Gliomdiagnostik noch nicht zufriedenstellend gelöst: Die Darstellung der Gliomrandzone, das Gliomgrading oder die Gliomvaskularisation bei der Erstdiagnose. Nach erfolgter Operation oder Strahlentherapie finden sich häufig Kontrastmittel-Anreicherungsmuster, die eine Differenzierung zwischen operationsinduzierten reaktiven Veränderungen (Radionekrose) und Rest- bzw. Rezidivtumor nicht ermöglichen. Die konventionelle MRT liefert höchst aufgelöste morphologische Daten über den Tumor und seine Umgebung. Funktionelle Informationen zur Biologie des Tumors (z.B. zum Wachstumsverhalten oder zur Tumorummunologie) ergeben sich hieraus jedoch nicht. Verschiedene, die konventionelle MRT ergänzende Techniken gewinnen seit einiger Zeit auch für die Bildgebung der Gliome große Bedeutung. Sie werden an dieser Stelle lediglich der Vollständigkeit halber in Tabelle 1 aufgeführt. Zum weiterführenden Studium wird auf die entsprechende Literatur verwiesen.

- Perfusions-MRT
- Diffusions-MRT
- Funktionelle MRT
- MR-Spektroskopie
- Nuklearmedizinische Untersuchungsverfahren (PET und SPECT)
- Xenon CT

Tabelle 1: Ergänzende Techniken zur konventionellen MRT

3.2.5 Therapie

Die initiale Behandlung ist die neurochirurgische Tumorresektion bei Schonung des umliegenden Gewebes (Frankel und German 1958; Green et al. 1983b; Berger 1994). Durch den Einsatz der Neuronavigation für die Eingriffsplanung und Tumorlokalisierung in Verbindung mit der MRT und intraoperativer Sonographie ist es möglich, selbst Tumoren in wichtigen Arealen sowie in tiefer liegenden Hirnregionen mit gutem funktionellen Ergebnis zu entfernen. Dabei hat die Vermeidung zusätzlicher neurologischer Dauerschäden den Vorrang gegenüber der operativen Radikalität. Durch das in der Regel invasive Wachstum des Glioblastoms ist eine neurochirurgische Totalresektion generell unmöglich, sodass in ca. 90% der Fälle ein Rezidiv in unmittelbarer Nachbarschaft des makroskopisch komplett entfernt erscheinenden Primärtumors beobachtet wird (Kleihues et al. 2000; Hofer et al. 2002; Reifenberger und Collins 2004; Weller et al. 2008). Inwieweit jedoch das Ausmaß der Resektion mit der Länge des Überlebens korreliert, wird kontrovers diskutiert (Wood et al. 1988; Kreth et al. 1993). Neuere prospektive Studien sprechen dafür, dass ein wichtiger prognostischer Faktor die makroskopisch vollständige Entfernung des Tumorgewebes ist (WHO Grad III und IV) (Prados und Levin 2000; Lacroix et al. 2001; Leitlinie DGN 2005).

Bei Tumoren, die nicht entfernt werden können, wird der Verlauf mehr durch das Resultat der Strahlentherapie bzw. Chemotherapie bestimmt. Die postoperative Bestrahlung der erweiterten Tumorregion verlängert die Überlebenszeit auf 35-40 Wochen. Die Chemotherapie zusätzlich zur Strahlentherapie trägt zu einer geringfügigen Verlängerung der postoperativen Überlebenszeit bei. So liegt die 1-Jahres-Überlebensrate mit Chemotherapie bei 41% und ohne bei 35%, die 2-Jahres-Überlebensrate bei 13% mit und 9% ohne Chemotherapie. Auch nach radikaler Tumorentfernung kommt es innerhalb von 6-12 Monaten immer zu einem Rezidiv (Prados und Levin 2000; Lacroix et al. 2001).

3.2.5.1 Strahlentherapie

Standardtherapie des Glioblastoms ist neben dem neurochirurgischen Eingriff seit mindestens 25 Jahren die Strahlentherapie der erweiterten Tumorregion (Laperriere et al. 2002). Im Vergleich zu alleiniger Strahlen- oder Chemotherapie mit Carmustin wurde mit der Strahlentherapie eine Verdoppelung der Überlebenszeit von ca. 4-5 auf 8-10 Monate erreicht. Dabei war ein wesentlicher Fortschritt gegenüber den ersten Studien die Erkenntnis, dass aufgrund der sehr hohen lokalen Rezidivrate die Bestrahlung der erweiterten Tumorregion ausreichend und die Ganzschädelbestrahlung somit entbehrlich ist (Hess et al. 1994). Die genauere Durchführung richtet sich nach der histologischen Charakterisierung und den Ausbreitungscharakteristika des jeweiligen Tumors, wobei als Kriterien lokale Infiltration, Tumorlokalisierung und Wirkung der Bestrahlung auf Tumor und gesundes Gewebe herangezogen werden. Diese Kriterien bestimmen Zielvolumina, Dosierungen, Fraktionierungen und Technik der Bestrahlung (Leitlinie DGN 2005).

3.2.5.2 Chemotherapie

Die Chemotherapie ist bei Hirntumoren aufgrund der natürlichen Barriere der BHS und dem Mangel der Tumorspezifität der Arzneistoffe besonders schwierig. Obgleich die Blut-Hirn-Schranke bei Hirntumoren nicht voll intakt ist, kann nicht von einer gleichmäßigen Erreichbarkeit aller Tumorareale ausgegangen werden. Beim Glioblastoma multiforme wird der Stellenwert einer Chemotherapie im Rahmen der Standardtherapie bzw. Primärtherapie kontrovers diskutiert. Sie wird als adjuvante oder konkomitante Therapie eingesetzt. Als adjuvant wird eine Therapie bezeichnet, die nach vollständiger operativer Entfernung aller erkennbaren Tumoranteile angewandt wird, um mögliche, bisher aber noch nicht nachweisbare Mikrometastasen zu bekämpfen. Der Begriff konkomitante Therapie bezeichnet eine simultan angewandte Chemo- und Strahlentherapie. Sie spielt eine große Rolle bei denjenigen Fällen, die wegen fortgeschrittener Erkrankung einer neurochirurgischen Therapie nicht mehr zugänglich sind (palliative Therapie) (Galanis und Buckner 2000). Ihr Ziel ist in erster Linie die Verlängerung der Überlebenszeit.

Da die physiologische BHS die Penetranz der Chemotherapeutika in das Interstitium des Zentralnervensystems hochgradig einschränkt, können lediglich nicht-proteingebundene, lipophile Substanzen diese Membran überschreiten (Sugiyama et al. 2007; Stupp et al. 2007). Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um die Gruppe der Nitrosoharnstoffe bestehend aus Nimustin (ACNU), Carmustin (BCNU), Lomustin (CCNU) (Amargisingh et al. 2009), Procarbazin (PCB) und Temozolomide (Temodal[®]) (Friedmann et al. 2000; Goerne et al. 2008). Sie alle wirken über eine Schädigung (Alkalisierung) der Erbsubstanz von Tumorzellen.

len. Durch ihre hohe Lipophilie gelangen sie relativ gut durch die BHS und erreichen im ZNS eine Plasmaaktivität von 30-40%. Nitrosoharnstoffe werden nicht nur als Monotherapien eingesetzt. Sehr häufig kommen sie in Kombinationsschemata zum Einsatz. Ein vielfach angewandtes Schema besteht aus Procarbazin, Lomustin und Vincristin (PCV) (Stupp et al. 2007). Vincristin ist ein hydrophiles Alkaloid, welches an das Protein Tubulin bindet und so die Ausbildung von Mikrotubuli hemmt. In der Folge kommt es zu keiner Zellteilung mehr. Durch diesen, im Vergleich zu anderen Zytostatika andersartigen Wirkmechanismus kann Vincristin zu einer Synchronisation des Zellzyklus der Tumorzellen führen und infolgedessen die Wirksamkeit von anderen eingesetzten Alkylanzien verbessern. Als Kombinationstherapie mit Nitrosoharnstoffen kommen zum Teil auch Podophyllotoxinderivate wie Etoposid (VP 16) (Teragaki et al. 2008) und Teniposid (VM 26) (Glas et al. 2009) zum Einsatz. Deren Wirkmechanismus beruht auf der Hemmung des Enzyms Topoisomerase II, was zu Doppelstrangbrüchen in der DNA führt. Eine aktuelle randomisierte multinationale Phase-III-Studie (EORTC 26 981/22 981/NCIC CE.3) (Weller 2005) zur konkomitanten und adjuvanten Chemotherapie des Glioblastoms mit dem Alkylans Temozolomid in der Primärtherapie des Glioblastoms zusätzlich zur Strahlentherapie belegt nun eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit gegenüber alleiniger Strahlentherapie von 12,1 auf 14,6 Monate sowie eine Erhöhung der 2-Jahres-Überlebensrate von 10% auf 26% (Gorcia et al. 2008; Stupp et al. 2009). Die Subgruppenanalyse zeigt, dass dieser Vorteil in der Gruppe der kombiniert behandelten Patienten vor allem auf den günstigeren Verlauf der Erkrankung bei Patienten zurückzuführen ist, die aufgrund einer Methylierung der Promoter-Region des O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Gens das MGMT-Genprodukt nicht exprimieren (Hegi 2005; Kim und Glantz 2006). MGMT ist ein Enzym, welches maßgeblich für die Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich ist, die durch alkylierende Chemotherapie verursacht werden. Bei der DNA-Reparatur wird MGMT verbraucht, so dass Temozolomid bei alternativen Therapieschemata mit prolongierter Tumorzelleexposition über eine MGMT-Depletion selbst zu einer Überwindung seines vermutlich wichtigsten Resistenzmechanismus beitragen könnte (Hegi et al. 2005). Die Studie EORTC 26 981/22 981/NCIC CE.3 definiert einen Meilenstein in der Therapie des Glioblastoms und wird als Basis für weitere Therapieoptimierungsstudien bei dieser nach wie vor unheilbaren Tumorerkrankung dienen (Stupp et al. 2005). Eine andere Option ist das Implantieren von bioabbaubaren Chemotherapie-trägern in die Resektionshöhle bei der Primärbehandlung des Glioblastoms. Der Einsatz von Carmustin-freisetzenden Implantaten (Gliadel[®]) zeigte in einer Studie mit 140 Patienten eine mediane Überlebenszeit von 14 Monaten im Vergleich zu knapp 12 Monaten mit Placebo. Die 1-Jahres-Überlebensrate wurde von 49% auf 59% mit Implantat erhöht; davon lebten 16% (Placebo 8%) länger als 2 Jahre und 9% (Placebo 2%) länger als 3 Jahre (Westphal et al. 2006).

Letztendlich haben Patienten mit einem Glioblastom trotz Tumorentfernung und anschließender Bestrahlung und Chemotherapie eine mediane Überlebenszeit von etwa 12-14 Monaten. Dies ist zurückzuführen auf das Auftreten von Lokalrezidiven oder der diffusen Infiltration des gesamten Gehirns. Ohne jegliche Therapie beträgt die mittlere Überlebenszeit der Patienten 4,9 Monate (Ohgaki und Kleihues 2005). Diese Mortalität ist damit eine der höchsten aller Tumorerkrankungen. Die Suche nach neuen, möglicherweise auch unkonventionellen Therapien, welche die Prognose von Patienten mit einem Glioblastom bei guter Lebensqualität verbessern, ist daher von großer Bedeutung.

Diese Ergebnisse der Chemotherapie speziell bei astrozytären Tumoren sind ernüchternd. Über die zugrunde liegenden Ursachen der Resistenz dieser Tumore gegenüber der zurzeit verfügbaren Zytostatika ist jedoch bisher wenig bekannt. Generell lassen sich zwei Problem-bereiche unterscheiden: Zum einen zählt das Vorhandensein der BHS als wesentliches Hindernis einer gleichmäßigen und ausreichenden Verteilung der Chemotherapeutika im Tumor als extrinsischer Faktor. Zum anderen gelten zellgebundene Resistenzmechanismen, die mit einer primären oder sekundären Chemotherapieresistenz der Tumorzellen assoziiert sind, als intrinsischer Faktor (Bart et al. 2000; Kemper et al. 2004).

Chemotherapeutika, welche die BHS ubiquitär überschreiten und damit in das gesamte ZNS penetrieren, weisen allerdings einen Nachteil auf: Ihre massive Neurotoxizität führt zu schwerwiegenderen Nebenwirkungen als die myelo- oder gastrointestinale Toxizität der peripher wirkenden Zytostatika. Neurotoxizität führt zu erheblichen Einbußen in der Lebensqualität und bedeutet aufgrund der geringen Regenerationsfähigkeit des neuronalen Gewebes häufig ein permanentes Defizit (Kemper et al. 2004; Weller, 2008).

Erst in den letzten Jahren wurde deutlich, dass nicht nur die Anzahl der Endothelzellen darüber entscheidet, welche Substanzen die Barriere passieren können oder welche nicht. Zu den zellgebundenen Transportmechanismen gehören so genannte Transportproteine, die in der Membran der Endothelzellen sitzen (Löscher 2005). Bislang kennt man 15 Transportproteine, die in den Gehirnkapillaren oder im Gehirnendothel entdeckt worden sind und speziell Arzneistoffe transportieren (Girardin 2006). Von herausragender Bedeutung für die Funktion der BHS ist ein spezielles Exportprotein, das "Multidrug-Resistenzprotein", auch "p-Glykoprotein" genannt. Es gehört zu der Familie der so genannten ABC-Proteine (ATP-Binding-Cassette-Proteins). Das p-Glykoprotein wurde Ende der 1970er Jahre in Tumorzellen entdeckt. Dort bewirkt es, dass die entarteten Zellen Zytostatika widerstehen, die sie eigentlich abtöten sollen. Sie werden "resistent", daher auch der Name Multidrug-Resistenzprotein (MDR) (Bauer et al. 2004; Zhou 2008). Das Protein wurde nicht nur in der

Membran von Tumorzellen gefunden. Es kommt in großer Anzahl überall dort vor, wo Gewebe eine exkretorische oder schützende Funktion haben. Das p-Glykoprotein ist damit ein wesentlicher Eliminationsmechanismus (Bart et al. 2000). In der BHS fängt es körperfremde und potenziell neurotoxische Substanzen bereits in der Membran der Endothelzellen ab und transportiert sie unmittelbar in den Blutkreislauf zurück. Zu den Medikamenten, die von dem p-Glykoprotein eliminiert werden, gehören verschiedenste Opioide, Steroide, Antibiotika, Kalziumkanal-Blocker, Zytostatika, das Immunsystem hemmende Substanzen, Medikamente gegen das AIDS verursachende HI-Virus (Humanes Immundefizienz-Virus, HIV), Beta-Blocker und viele andere mehr (Drewe et al. 1999; Rao et al. 1999).

Eine Möglichkeit, die Durchlässigkeit von Tumoren, die p-Glykoprotein enthalten, zu erhöhen oder die BHS selbst durchlässiger zu machen, ist, p-Glykoprotein an seiner Exportfunktion zu hindern. Diese Funktion übernehmen Inhibitoren, die gleichzeitig mit dem Chemotherapeutikum appliziert werden. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch kein derartiges Präparat, welches für den klinischen Gebrauch zugelassen ist. Untersuchungen an Mäusen sind jedoch sehr viel versprechend (Fellner et al. 2002). Bei diesem neuen Ansatzpunkt ist zu bedenken, dass p-Glykoprotein nicht exklusiv im gewünschten Zielorgan gehemmt wird, sondern überall dort, wo es vorkommt. Dies ist einer der Gründe dafür, warum noch nach anderen Wegen gesucht werden muss, um die BHS gezielt zu überwinden. Ein neuer Ansatz ist, so genannte Nanopartikel anzuwenden, die einen nicht invasiven, zielgerichteten Wirkstofftransport zum Zielgewebe ermöglichen und so zu einer Anreicherung der Zytostatika führen, möglichst ohne die so gefürchteten Nebenwirkungen einer systemischen Chemotherapie (Fricker, Pressemitteilung Uni Heidelberg, 2005; Reimhold et al. 2008).

3.2.5.3 Experimentelle Therapieansätze

Die so genannten biologischen Therapien bekämpfen Hirntumorzellen durch selektive Beeinflussung ihrer physiologischen Eigenschaften oder durch Modulation der physiologischen Umgebung (Westphal und Lamszus 2009). Dazu zählen die Gentherapie (Hutterer et al. 2006; Natsume und Yoshida 2009), Immuntherapie (Kahn-Farussi et al. 2005; Okada et al. 2009), antiangiogenetische Therapie (Norden et al. 2008; Martin et al. 2009) sowie Immunotoxintherapie (Shimakra et al. 2006; Rainov und Söling 2009). Die tumorselektive Wirkung dieser Methoden in Kombination mit dem ausgezeichneten biologischen Sicherheitsprofil scheinen vielversprechend zu sein. Bisher fehlt allerdings der für eine standardisierte klinische Anwendung erforderliche und nur in großen Studien zu gewinnende Nachweis ihrer Wirksamkeit. Trotzdem ist dies ein interessanter Therapieaspekt, der eine Vielzahl an Forschungsmöglichkeiten bietet.

3.2.5.4 Genterapie

Genterapie im engeren Sinne bedeutet die künstliche Veränderung des Erbgutes erkrankter Körperzellen, zu denen auch Tumorzellen gerechnet werden (Schlegel und Westphal 1997). Besonders modifizierte Viruspartikel oder auch physikalisch definierte Partikel (Liposomen, Goldpartikel), auch Vektoren genannt, dienen als Gen-Übertragungswerkzeuge (Culver et al. 1992). Die bislang am häufigsten benutzten Genterapie-Vektoren wurden von Retroviren abgeleitet. Auf der Grundlage anderer Virustypen, z.B. dem Adenovirus, werden zurzeit weitere Genterapie-Vektoren der neuen Generation konstruiert. Sie sollen größere Mengen genetischer Informationen auch in sich nicht-teilende Zellen einschleusen und im Körper des Patienten wesentlich stabiler und zugleich nebenwirkungsärmer sein (Hofer und Merlo 2002, Parney 2003).

Da besonders hochgradige Gliome schnell wachsen und das umgebende normale Hirngewebe rasch infiltrieren, scheint allerdings eine lokale intratumorale Genterapie mittels Vektor-Einzelinjektionen als alleinige Behandlungsoption nicht sehr geeignet zu sein. Demgegenüber ist diese Art der Genterapie als Zusatzoption zur neurochirurgisch-radiotherapeutischen Standardbehandlung sinnvoll und könnte möglicherweise auch die Wirksamkeit einer Chemotherapie verbessern. Die bisher weltweit größte Studie zur Genterapie musste allerdings im Jahr 1999 (Dewey et al. 1999) wegen bewiesener Unwirksamkeit abgebrochen werden. Dabei erhielten 300 Patienten Gene, die für „Pro-drug“-aktivierende Enzyme, so genannte Selbstmordgene, kodieren. Die Herpes Simplex Virus Thyminkinase (HSV-TK) ist ein Enzym, welches nicht toxisches Gancyclovir zu zytotoxischem phosphoryliertem Gancyclovir umwandeln kann. Die Überlebenszeit der Patienten wurde so nicht verlängert. Insgesamt scheiterte der Versuch daran, dass die heilsamen Gene nur einen Bruchteil der Tumorzellen erreichten (Rainov 2000).

Im Jahr 1992 begann eine international besetzte Arbeitsgruppe in Heidelberg unter der Leitung von Professor Jean Rommelaere mit der intensiven Forschung in der Tumorigenese (Koering et al. 1994). Die Heidelberger Forscher spezialisierten sich auf autonome Parvoviren, die durch ihren Anti-Tumor-Effekt in der Lage sind, Tumorzellen abzutöten, ohne ernsthafte Erkrankungen hervorzurufen. Die Zellteilung der Tumorzellen und die Virusvermehrung sind eng aneinander gekoppelt. Im Rahmen dieser gegenseitigen Beeinflussung werden große Mengen des viralen Proteins NS1 gebildet, welches direkt verantwortlich für den onkolytischen Effekt ist. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. In vitro Versuche zeigten, dass das Parvovirus H-1 in der Lage ist, Glioblastomzellen zu infizieren und zu töten. In Mäusen verhinderten sie gar das Entstehen von Tumoren (Nanda et al. 2001). Ratten als auch Mäuse zeigten keinerlei Entzündungsreaktionen oder Krankheits-

symptome nach einer Virusinjektion ins Gehirn (Herrero et al. 2004). Ohshima et al. (1998) beobachtete bei neugeborenen Sprague-Dawley-Ratten apoptotische Veränderungen im Zerebellum. Bereits in den Jahren 1965 (Toolan et al.) und 1993 (LeCesne et al.) wurden zwei klinische Studien mit Patienten durchgeführt, die an einer fortgeschrittenen Krebserkrankung litten. Sowohl die subkutane Injektion als auch die intravenöse Verabreichung der Parvoviren führten zu keinerlei Nebenwirkungen. Bei einer möglichen Ausbreitung des Virus in das ZNS könnten, so die Autoren, eventuell später auftretende Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen werden.

Die neueste Entwicklung im Bereich der Virustherapie beschäftigt sich mit genveränderten, rekombinanten Parvoviren. Die Heidelberger Forscher ersetzen einen Teil des Erbguts der Viren mit Genen von Zytokinen. Infizierte Tumorzellen bilden ihrerseits Zytokine, die dann in der Lage sind, auch nicht durch den Virus direkt infizierte Zellen zu erreichen (Di Piazza et al. 2007).

3.2.5.5 Anti-Angiogenese

Angiogenese ist eines der erforderlichen histologischen Merkmale bei der Diagnostik hochmaligner Gliome. Die Grundlagenforschung zeigt, dass mehrere Signalwege der Neoangiogenese der Gliome Grad II und IV hochreguliert sind (Brem et al. 1972). Aus diesem Grund stellt die Bekämpfung der Tumorangiogenese auch einen der logischen und hoffnungsvollen Entwicklungsbereiche für die Gliomtherapie dar. Vergleichsstudien, in denen Angiogenesehemmer oder Zytostatika bei rezidierten Glioblastomen gegeben wurden, verliefen enttäuschend und wurden frühzeitig abgebrochen (Norden et al. 2008). Jedoch gibt es sehr vielversprechende Ansätze bei gleichzeitiger Anwendung antiangiogen wirkender Substanzen mit Chemotherapie oder Radiotherapie (Carter 2000). In einer Phase I/IIa-Studie wurden 51 Patienten (Nabors et al. 2007) mit neu diagnostiziertem Glioblastom nach Tumorresektion oder Biopsie mit Cilengitide, einem Integrin-Inhibitor, in Kombination mit einem Standard-schema aus Strahlentherapie und dem Chemotherapeutikum Temozolomid behandelt. Mit 69% progressionsfreien Patienten zum Zeitpunkt sechs Monate erreichte die Studie den vordefinierten primären Endpunkt und erzielte ein mittleres progressionsfreies Überleben von 8,1 Monaten (Nabors et al. 2007). Ähnlich erfolgreich war auch die Kombination von Bevacizumab (VEGF-Rezeptorblocker) mit Irinotecan (Topoisomerase-Hemmer) (Vredenburgh et al. 2007). In einer klinischen Phase-II-Studie sprachen 57% der Patienten auf die Therapie an, bei 46% wurde binnen sechs Monaten kein erneutes Tumorwachstum beobachtet. Mit der Beurteilung des Therapieverlaufs beschäftigte sich eine weitere Studie (Chen et al. 2007). Hier erfolgte die Darstellung der biologischen Aktivität des Tumors mithilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Bezüglich der Charakterisierung der biologischen Ak-

tivität von Gehirntumoren wurde ein Marker, das 18F-Fluoro-L-Thymidin (FLT), eingesetzt. Chen et al. kamen zu folgenden Ergebnissen: 47% der untersuchten Patienten sprachen auf die Therapie an, 65% blieben sechs Monate progressionsfrei. Die metabolisch sichtbare Wirksamkeit korrelierte mit den Kontrollaufnahmen eines MR-Tomographen sowie mit dem Gesamtüberleben der Patienten (Chen et al. 2007).

3.2.5.6 Stammzellforschung

Andere, auch eher experimentelle Therapieansätze stützen sich auf Versuche mit Stammzellen zur Therapie eines bösartigen Hirntumors. Sakariassen et al. (2006) konnten bereits zeigen, dass es Stammzellen gibt, die zwar hochgradig invasiv sind, jedoch einen Angiogenese-unabhängigen Phänotyp besitzen. In präklinischer Erprobung befinden sich bereits Untersuchungen mit körpereigenen Blutstammzellen, mit deren Hilfe sich möglicherweise therapeutische Gene in Gliomzellen einschleusen lassen. Die im Tumorrandbereich vorherrschende Hypoxie scheint hämatopoetische Stammzellen anzuziehen (Tabatabai et al. 2006). Klinische Studien sind für 2009 geplant (Tran et al. 2007).

3.2.5.7 Tierexperimentelle Studien

Ein weiterer beispielhafter experimenteller Ansatz ist die Behandlung mit Nanoteilchen (Maier-Hauff et al. 2007). Diese bestehen aus einem Eisenoxidkern sowie einer Hülle, die das Eindringen der Partikel in die Krebszellen erleichtern soll. Die Partikel werden direkt in den Tumor injiziert. In mehreren Durchgängen wird der so mit den Eisenoxidpartikeln angereicherte Tumor mit Magnetwechselfeldern auf über 46°C erwärmt. Im Tiermodell ergaben sich deutlich verbesserte Überlebenszeiten. Ergebnisse randomisierter kontrollierter Studien beim Menschen liegen noch nicht vor, Studien befinden sich aber in der klinischen Prüfung (Wust et al. 2006).

3.3 Glioblastome bei Hund und Katze

Durch die zunehmende Anwendung moderner diagnostischer Verfahren wie der MRT und der CT, ist es auch in der Veterinärmedizin möglich geworden, neoplastische Gehirnveränderungen prä mortal zu diagnostizieren. Nolte et al. konnten 2005 eine bis dato bestehende Darstellung intrakranieller Tumoren und ihrer Demarkation weiter verbessern. Sie verwendeten dafür superparamagnetische Eisenoxide (SPIO) als Kontrastmittel.

Primäre Gehirntumoren treten beim Hund mit einer Inzidenz von 14,5 Fällen pro 100.000 im Jahr auf und sind damit häufiger als beim Menschen (Lipsitz et al. 2003). Bei Hunden und Katzen scheint eine Prädisposition zur Entstehung von Meningiomen zu bestehen, mit einer Häufung zwischen dem 8. und 9. Lebensjahr (Bagley et al. 1999). Weiterhin sind Gliome (Oligodendrogliom und Astrozytom) häufig, seltener kommen Choroidplexuskarzinome und Hypophysentumore vor (LeCouteur 1999). Das Glioblastom ist weltweit bei Hunden sehr selten, bei der Katze tritt es etwas häufiger auf. Bei Hunden sind brachycephale Rassen häufiger betroffen mit einer Rassedisposition für Boston Terrier, Englische Bulldogge und Boxer (Stoica et al. 2004). Die caninen glialen Tumoren sind den humanen sowohl morphologisch als auch immunhistologisch sehr ähnlich. Auch die Lokalisation in den Gehirnhemisphären, dem Thalamus, dem Hypothalamus und dem Stammhirn entspricht der des Menschen (Stoica et al. 2004). Die Tiere zeigen, je nach Lokalisation, Symptome wie Ataxien, Kopfschiefhaltung, Nystagmus und Somnolenz (Lipsitz et al. 2003).

Auch in der Veterinärmedizin gibt es chemotherapeutische Ansätze bei der Behandlung intrakranieller Neoplasien. Die Bedeutung ist allerdings marginal, da die Tumoren im Allgemeinen schlecht auf zytotoxische Substanzen ansprechen. Eine Verlängerung der Überlebenszeiten konnte nicht festgestellt werden (Dobson et al. 2003). Forterre et al. (2000) berichten über gute Ergebnisse bei der adjuvanten Behandlung des Meningioms der Katze mit dem Zytostatikum Hydroxurea. Auch bei der aufwendigen Strahlentherapie ist der Erfolg durch die geringe Strahlensensitivität der Gehirntumore beschränkt. Vergleichend mit der Humanmedizin stellt die operative Therapie den wichtigsten Bestandteil der Therapie dar (Forterre et al. 2000).

3.4 Experimentelle Glioblastom-Modelle

Tiermodelle gelten seit Beginn der 1970er Jahre als adäquate Möglichkeit, die Wirksamkeit neuer Therapieansätze in der Behandlung von Gehirntumoren zu erforschen. Die Ausgangsstudien bezogen sich auf die intravenöse Injektion von z.B. N-Methyl N-Nitrosoharnstoff zur Induktion von Tumoren im zentralen Nervensystem (Druckery 1964). Es folgte eine ganze Anzahl von Gehirntumormodellen, die gut charakterisiert, einfach reproduzierbar und applizierbar sind. Sie unterscheiden sich in der verwendeten Tierart, der Tumorzelllinie, der Menge der implantierten Gliomzellen, der Inokulationslokalisierung sowie dem Behandlungsbeginn und der Applikationsmethodik der angewendeten Therapeutika (Beauchesne et al. 2003, Schmidt et al. 2004, Tseng et al. 2004; Iwadata et al. 2005). Folgende Anforderungen sind an alle Gehirntumormodelle zu stellen: Die Tumorzellen sollten von glialen Zellen abstam-

men. Die Wachstumsrate des Tumors, ebenso die malignen Charakteristika sollen vorhersehbar und reproduzierbar sein. Außerdem sollten für das Glioblastom spezifische Merkmale wie invasives Wachstum, Neovaskularisation und Veränderungen der BHS vorhanden sein (Goldbrunner 2000b).

Das invasive Wachstum menschlicher Gliome ist das Ergebnis aus komplexen Interaktionen zwischen Gliomzellen und gehirnspezifischer extrazellulärer Matrix. Aus diesem Grund ist eine orthotope Implantation (also die Implantation von Hirntumorzellen in Hirngewebe) und das dortige Wachstum als wichtige Anforderung an Tiermodelle zu erwähnen (Goldbrunner 2000b). Das 9L Glioblastom ist das am weitesten verbreitete Tumormodell (Weizsaecker et al. 1981) und wird diesen Anforderungen gerecht. Zudem hat es den Vorteil einer 100%igen Anwachsrate und eines regelmäßigen Wachstums, was den Vergleich zum humanen Glioblastom vereinfacht (Saini et al. 1999).

Das Wachstum der intrazerebral induzierten Tumoren kann seit einigen Jahren mittels MRT-Bildgebung dargestellt werden (Bendszus 2002). Damit sind nicht invasive Verlaufskontrollen, das Anreicherungsverhalten verschiedener Kontrastmittel sowie die Visualisierung von Behandlungserfolgen möglich geworden (Goldbrunner 2000a, Goldbrunner 2000b, Thorsen et al. 2003). Die Verwendung eines klinischen 1,5 Tesla-Ganzkörper-Magnetresonanztomographen demonstriert eine leicht zugängliche Methode für in vivo Untersuchungen am Rattenhirn. Aus den genannten Gründen wurde das 9L-Modell für diese Arbeit ausgewählt.

3.5 MRT

Die MRT kann aufgrund ihres hohen Weichteilkontrastes anatomische Details besser darstellen als die CT. Daher wird sie bei entsprechenden Fragestellungen bevorzugt eingesetzt (Bragg und Osborn 1991, Byrne 1994). Die beliebig wählbare Schnittführung, die genaue Analyse der Lagebezeichnung, die bessere Auflösungsfähigkeit und geringere Artefaktanfälligkeit bei schädelbasisnahen Prozessen oder Hirnstammtumoren machen die Überlegenheit aus. Auch lassen sich Gliome z.T. schon in einem frühen Stadium mit einer hohen Präzision erfassen (Grodd und Voigt 1997). In der MRT führen Gliome typischerweise zu einer Verlängerung der T1- und der T2-Relaxationszeit und erscheinen so hypointens in T1-gewichteten, hyperintens in T2-gewichteten und meist ganz gering hyperintens in Protonen-Dichte (PD)-gewichteten Sequenzen. Nach Kontrastmittelgabe lassen sich solide, zystische und nekrotische Tumoranteile von einem perifokalen Ödem abgrenzen.

3.5.1 Grundlagen

Die MRT wird als bildgebende Methode seit Anfang der 1980er Jahre in der Diagnostik eingesetzt und ist damit ein relativ junges, nicht invasives bildgebendes Verfahren, das auf dem Prinzip der Kernspinresonanz beruht. Die Kernspinresonanz wurde von Bloch und Purcell unabhängig voneinander 1946 entdeckt (Bloch und Purcell et al. 1946), beide erhielten dafür den Nobelpreis für Physik.

3.5.2 Voraussetzung für die MRT

In der medizinischen Bildgebung werden Kerne von Wasserstoffatomen verwendet, da sie am häufigsten vorkommen. Der Wasserstoffatomkern bietet sich deshalb an, da er mit nur einem Nukleon, einem Proton, ein relativ großes magnetisches Moment besitzt und zudem das am häufigsten in biologischen Systemen vorkommende Isotop ist. Eine Grundeigenschaft der Elementarteilchen ist die Drehbewegung um die eigene Achse des Kerns (Kern-drehimpuls = Spin). Dabei handelt es sich um eine rotierende elektrische Ladung, die ein magnetisches Moment erzeugt, das in einem magnetfeldfreien Raum statistisch in alle Richtungen orientiert ist. Wird ein äußeres Magnetfeld angelegt, richten sich die Spins der Atomkerne entlang dieses Feldes aus, entweder in der energetisch höherwertigen antiparallelen oder der energetisch niedrigeren parallelen Stellung. Es bildet sich eine messbare Längsmagnetisierung in Richtung des angelegten Magnetfeldes aus, welche zu einer Veränderung der Rotationsachse der Spins führt, die nun zusätzlich eine Kreisbewegung in Form eines Kreisels durchführen. Diese Kreisbewegung wird Präzessionsbewegung genannt und hat eine charakteristische Frequenz, die Larmorfrequenz. Die Larmorfrequenz ist proportional zu der Stärke des angelegten Magnetfeldes und Grundlage der MR Bildgebung. Ein Hochfrequenzimpuls, der dieselbe Frequenz wie die Protonen trägt (Larmorfrequenz), sorgt nun für eine Energieübertragung, indem er die Protonen von ihrer parallelen Ausrichtung in den antiparallelen Zustand bringt. Dieses Phänomen wird als Resonanz bezeichnet. Der Effekt der Resonanz ist, dass sich neben der anfänglichen Longitudinalmagnetisierung eine dazu senkrechte Transversalmagnetisierung ausbildet, welche bei der Magnetresonanztomographie in ihrem zeitlichen Verlauf gemessen wird. Wie viele Wasserstoffatomkerne diesen Energiewechsel vollziehen, hängt von der Leistung der eingestrahlten Hochfrequenz ab. Dadurch ändert sich die Gesamtmagnetisierung. Die vorher ungeordneten Präzessionsbewegungen der Protonen werden durch den Impuls synchronisiert, sie präzedieren in Phase. Die zeitliche und örtliche Bewegung der Spins bei den Übergängen zwischen den beiden Energieniveaus erzeugt in der Empfangsspule eine Wechselspannung, das MR-Signal (Semmler 1997; Weishaupt et al. 2006).

3.5.3 Relaxation

Sobald der Hochfrequenzimpuls abgeschaltet wird, kehrt das gesamte System in den ursprünglichen, stabilen Zustand mit longitudinaler Magnetisierung zurück, es relaxiert. Nach diesem Prozess kann ein Atomkern erneut angeregt werden. Die Zeitkonstanten, mit denen die Wasserstoffatomkerne den Gleichgewichtszustand wieder erreichen, werden Relaxationszeiten genannt. Unterschieden wird zwischen longitudinaler (T1) und transversaler (T2) Relaxation (Brix et al. 1997).

Die T1-Relaxation resultiert aus der Wiederherstellung der longitudinalen Magnetisierung nach Energieabgabe an das umliegende Gewebe, auch als Spin-Gitter-Wechselwirkung bezeichnet. Die T1-Relaxationszeit beträgt im lebenden Organismus zwischen 100-1000 ms. Die T2-Relaxation resultiert in der Abnahme der Transversalmagnetisierung, hervorgerufen durch Interaktionen zwischen den Magnetfeldern benachbarter Atomkerne, Spin-Spin-Wechselwirkung genannt. Sie stellt somit eine Dephasierung dar und liegt zwischen 10-1000 ms. Die T2*-Relaxationszeit ist eine zusätzliche Dephasierung, verursacht durch Inhomogenitäten des äußeren Magnetfeldes, wie z.B. durch das MR-Gerät selbst oder den Körper des zu untersuchenden Patienten (Reiser und Semmler 1997).

Die verschiedenen Relaxationszeiten sind stark von dem jeweiligen Gewebe abhängig und spielen für die Kontrastgebung eine entscheidende Rolle. Die Umgebung der Protonen beeinflusst die Dauer der Relaxationszeiten, daher ergeben sich charakteristische Zeiten für die entsprechenden Körpergewebe und Organe (Brix et al. 1997).

3.5.4 Signalintensität und Bildkontrast

Um ein MR-Bild zu erhalten, muss eine Schicht mehrere Male nacheinander angeregt und gemessen werden. Für die Anregung der Wasserstoffatomkerne werden die bereits zuvor erwähnten Hochfrequenzimpulse, in der Gesamtheit Pulsfrequenz bezeichnet, eingestrahlt. Die Pulse werden in bestimmten Abständen wiederholt, wobei die Zeit zwischen zwei Anregungen derselben Schicht Repetitionszeit (TR) genannt wird. Die Repetitionszeit beeinflusst stark den T1-Kontrast, da sie bestimmt, wie lange die Protonen Zeit haben, in den ursprünglichen Zustand zurückzukehren und für einen erneuten Impuls zur Verfügung zu stehen (Weishaupt et al. 2006). Wird die Repetitionszeit kurz gewählt, so beeinflusst die T1-Relaxationszeit wesentlich den Bildkontrast. Gewebe mit einer kurzen T1-Relaxationszeit relaxieren schnell und geben nach einer erneuten Anregung viel Signal, sie erscheinen im MR-Bild hell, man nennt es dann T1-gewichtet. Gewebe mit einer langen T1-Relaxationszeit

geben so weniger Signal ab und erscheinen auf T1-gewichteten Bildern dunkel (Brix et al. 1997, Weishaupt et al. 2006).

Die Echozeit (TE) ist diejenige Zeitspanne, die man nach der Anregung bis zur Messung verstreichen lässt, sie bestimmt den Einfluss von der T2-Relaxationszeit auf den Bildkontrast. Je länger die Echozeit gewählt wird, desto mehr Spins dephasieren und umso stärker ist der Signalverlust. Ein Gewebe mit einer langen T2-Relaxationszeit verliert bei langer TE nicht so schnell an Signal wie ein Gewebe mit kurzer T2-Relaxationszeit, daher erscheinen auf T2-gewichteten Bildern Gewebe mit einer langen T2-Relaxationszeit hell.

Durch die Variabilität bzw. unterschiedliche Wichtung besitzt die MRT ein großes diagnostisches Potential (Brix et al 1997).

3.5.5 Sequenzen

Eine Sequenz ist in diesem Zusammenhang eine Kombination aus Radioimpulsen und Magnetfeldern bestimmter Frequenz bzw. Stärke, die vielfach in jeder Sekunde in vorgegebener Reihenfolge ein- und ausgeschaltet werden.

Die Sequenzen eröffnen zahlreiche verschiedene Möglichkeiten der Signalgewinnung, die der jeweiligen Fragestellung angepasst werden müssen. Konventionelle Sequenzen erhalten einen Anregungsimpuls von mindestens 90° , da nur die transversale Magnetisierungskomponente einer direkten Messung zugänglich ist. Die gängigen Sequenzen kombinieren 90° - und 180° -Impulse mit unterschiedlicher Anzahl, Reihenfolge und TR-Zeiten. Die klassische Spin-Echo-Sequenz (SE) und die schnelle Gradientenechosequenz (GRE) spielen in der MRT eine wichtige Rolle. Die Unterscheidung liegt in der Art, wie das Echo erzeugt wird (Schild 1997; Köchli und Marincek 1998).

Spin-Echo-Sequenz

Bei der SE-Sequenz erfolgt die Anregung mit einem 90° -Impuls. Das bewirkt, dass die Spins in die Transversale „gekippt“ werden und mit der T2*-Relaxationszeit dephasieren, die Transversalmagnetisierung zerfällt. Nach der Hälfte von TE wird ein 180° -Impuls eingestrahlt. Die unterschiedliche Dephasierung der einzelnen Spins nach dem 90° -Impuls wird somit in ihrem Vorzeichen umgekehrt. Die zuvor schneller präzedierenden Spins laufen jetzt den langsameren Spins hinterher, um nach der zweiten Hälfte der Echozeit aufzuholen und mit diesen zusammen ein maximales Signal zu geben. Dieses maximale Signal äußert sich in einem Anstieg des Signals in der Empfangsspule, dem so genannten Spin-Echo. Bei einer

SE-Sequenz ist die Signalintensität einerseits von der Protonendichte, andererseits auch von der T1- und der T2-Relaxationszeit abhängig, daher kann man auch beide Relaxationszeiten berechnen (Brix et al 1997, Weishaupt et al. 2006).

Gradientenechosequenz

In bestimmten Situationen ergeben sich die Forderungen nach einer Messzeitverkürzung, hauptsächlich um Bewegungsartefakte zu reduzieren. Um eine derartige Verkürzung zu realisieren, bedient man sich der so genannten Kleinwinkelanregung, bei der ein Hochfrequenz-Impuls mit einem Anregungswinkel kleiner als 90° gewählt wird. Durch den Wegfall des 180° -Impulses sind die TE-Zeiten geringer. Die Bildqualität ist aufgrund der fehlenden Kompensation der statischen Feldinhomogenitäten schlechter als bei SE-Sequenzen (Köchli und Marincek 1998). Vereinfacht dargestellt werden die angeregten Spins durch den Frequenzgradienten erst de- und dann nach der Echozeit TE wieder rephasiert. Das Resultat ist eine volle Magnetisierung, das Gradientencho (GRE). Diese Sequenzen sind also Schnellbildsequenzen auf Basis der Kleinwinkelanregung, bei denen das Echosignal durch eine Gradientenumkehrung erfolgt (Brix et al 1997; Schild 1997).

3.6 Kontrastmittel in der MRT

3.6.1 Einleitung

Mit der Einführung der MRT bestand zunächst die Auffassung, dass wegen des ausgezeichneten Gewebekontrasts Kontrastmittel (KM) zur Verstärkung entbehrlich seien. Es zeigte sich jedoch schnell, dass auch für die MRT der Einsatz von Kontrastmitteln, ähnlich wie für die Computertomographie vorteilhaft ist. Als Kontrastmittel wählt man ein paramagnetisches Element (z.B. Mangan, Gadolinium oder Eisen), das zur Intensitätsveränderung des Signals und damit möglichst zur Kontrastanhebung in der MRT führt. Mittlerweile existieren fünf verschiedene, für die klinische Anwendung zugelassene Substanzklassen. Hierzu zählen:

Niedermolekulare Gadoliniumchelate

Höher konzentrierte Gadoliniumchelate

Proteinbindende Gadoliniumchelate

Hepatobiliäre Kontrastmittel

Superparamagnetische Eisenoxidpartikel

Die unspezifischen Gadolinium (Gd)-Verbindungen sind vielseitig einsetzbar und heute der Standard. Eine spezifische Kontrastierung bestimmter Kompartimente oder Gewebe ist mit diesen Substanzen aber nicht möglich. Diese Überlegung führte zu der Entwicklung von Kontrastmitteln auf der Basis nanopartikulärer Eisenoxide (Saini et al. 1987, Weissleder et al. 1990, Weissleder et al. 1991, Reimer et al. 1991, Weissleder et al. 1992, Reimer et al. 1996). Eisenoxid-Nanopartikel haben starke signalbeeinflussende Eigenschaften in der MR-Bildgebung, dabei werden signalverstärkende und signalmindernde Effekte ausgenutzt. Für spezifische Anwendungen, die meistens mit einer intrazellulären Aufnahme des Kontrastmittels einhergehen, bieten Eisenoxid-basierende Substanzen gegenüber Gd-haltigen Verbindungen hinsichtlich toxikologischer Aspekte einen weiteren Vorteil (Reimer et al. 1990). So konnten bei Kontrastmitteluntersuchungen mit dextranummantelten SPIO (Superparamagnetic Iron Oxide) weder neuro-, hepato- oder histotoxische Schäden festgestellt werden (Brillet et al. 1991). Auch das Allgemeinbefinden der Tiere war während der Versuche ungestört und die Leberwerte blieben im Normbereich (Hamm et al. 1994). Hinsichtlich der Nephrotoxizität wurden selbst bei der 10-fachen klinischen Dosis keine Auffälligkeiten festgestellt (McLachlan et al. 1994, Schulze et al. 1995, Lawaczek et al. 1997). Nach dem Abbau der Partikel wird das Eisen letztendlich in den Eisen-Pool des Körpers überführt (Weissleder et al. 1989).

Bei der MR-Diagnostik der Leber werden die Eisenoxidpartikel ohne weitere Markierung von Zellen des Mononukleären Phagozyten Systems (MPS) aufgenommen und führen so zu einer Abgrenzung von intrahepatischem Fremdgewebe ohne phagozytierende Zellen. In Glioblastomen sind Zellen des MPS deutlich vermehrt. Morphometrische Studien ergaben, dass bis zu 50% der Tumormasse aus Makrophagen bzw. Mikroglia besteht. Dabei befinden sich aktivierte Mikroglia hauptsächlich an der Tumorperipherie (Roggendorf et al. 1996). Fleige et al. (2001) konnten bei einem Versuch mit USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles) zeigen, dass diese Zellen dextranummantelte Partikel phagozytieren und so im MR sichtbar machen. Durch diese Arbeit wird deutlich, dass die Visualisierung eines Glioblastoms mittels der MRT hauptsächlich auf der Markierung der Mikroglia durch eisenhaltige USPIO und nicht durch die Tumorzellen als solche basiert. Diese magnetische Markierung des MPS des Gehirns ist auch bei anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen, wie z.B. beim Staging der Multiplen Sklerose einsetzbar (Dousset et al. 1999). In einer Studie mit Ratten (Kim et al. 2008) wurde eine fokale zerebrale Ischämie durch endovaskulären Verschluss der Arteria cerebri media induziert. Nach einer Stunde erhielten die Tiere intravenös eisenhaltige Partikel (SPIO), und anschließend wurden sie im MR-Tomographen gemessen. Zu unterschiedlichen Messzeiten sollte die Reperfusion des ischämischen Hirnareals untersucht werden. Mithilfe der SPIO konnte gezeigt werden, dass aktivierte Mikroglia am Prozess der Reperfusion beteiligt sind (Kim et al. 2008).

Um die Eisenoxid-Nanopartikel auch für die Diagnostik anderer Organsysteme einzusetzen, ist es nötig, das MPS zu umgehen. Dies ist über eine Reduzierung der Größe oder die Variation der Oberflächenbeschaffenheit der Partikel zu erreichen (Anzai et al. 1997; Prince et al. 2003). Alle bisher zum Einsatz kommenden Eisenoxidpartikel basieren auf dem Prinzip der sterischen Stabilisierung mit einer ausreichend dicken Polymerhülle, die eine Aggregation der Eisenoxid-Kristalle im physiologischen pH-Bereich verhindert. Diese Eigenschaft hat Limitationen bezüglich der Größe (15-20 nm). Eine weitere Zunahme der Größe erhöht die Wahrscheinlichkeit der schnellen Phagozytose der Partikel in Leber und Milz, das Spektrum größerer Partikel für in vivo Anwendungen ist somit eingeschränkt.

Ein neuer Entwicklungsweg ersetzt die sterische Stabilisierung durch eine elektrostatische Stabilisierung. Realisierbar wurde dies durch die Ummantelung mit monomeren Molekülen, die einerseits im Sinne eines Chelators an die Eisenoxidoberfläche binden, andererseits durch eine starke Oberflächenladung zu der elektrostatisch bedingten Abstoßung der Partikel untereinander führen, wodurch eine Aggregation verhindert wird. Die Herstellung von Partikeln mit theoretisch minimalen Gesamtdurchmessern von etwa 5 nm wird möglich. Zudem ist es möglich, im Laufe des Herstellungsprozesses das Verhältnis zwischen signalsteigernder und signalmindernder Wirkung gezielt einstellen zu können (Pilgrimm 1997). Derartige elektrostatisch stabilisierte Nanopartikel könnten daher aufgrund ihrer geringen Partikelgröße und signalbeeinflussenden Eigenschaften gegenüber herkömmlichen, sterisch stabilisierten Partikeln als Kontrastmittel in der MR-Bildgebung ein erweitertes Anwendungsspektrum bieten.

3.6.2 Wirkungsweise der Kontrastmittel

Die Differenzen der Signalintensitäten (SI) der verschiedenen Gewebe bestimmen den Bildkontrast im MR-Bild. Diese Signalintensitäten sind wiederum abhängig von gewebe- und gerätespezifischen Parametern. Die gerätetechnischen oder extrinsischen Faktoren TR und TE können am Gerät variiert werden, die gewebespezifischen oder intrinsischen Faktoren können durch von außen in den Körper eingebrachte Substanzen verändert werden. MR-Kontrastmittel sind Substanzen, die die intrinsischen Eigenschaften der Gewebe verändern, um die Differenzen der SI zu erhöhen. Eine effiziente Änderung des Bildkontrasts ist am ehesten durch eine Beeinflussung der T1- oder T2-Relaxationszeiten zu erreichen (Ramm et al. 1986, Reiser und Semmler 1997).

Die verwendeten Kontrastmittel in der MRT sind magnetisch wirksame Substanzen, die selber nicht bildgebend sind, aber durch eine Veränderung des lokalen Magnetfeldes eine Re-

laxationszeitverkürzung der Protonen bewirken. Dies beruht auf einer Wechselwirkung mit den in der Umgebung befindlichen Protonen der Wasser-, Fett- oder Eiweißmoleküle (Rumor 1996; Köchli und Marincek 1998). Das Maß der Stärke der Relaxationszeitverkürzung (T1 oder T2) ist die Relaxivität (R1 oder R2) mit der Einheit [1/(mmol x sec)]. Je höher die Relaxivität (R1 oder R2) eines Stoffes oder Gewebes ist, umso kürzer werden die Relaxationszeiten der Protonen in Abhängigkeit von der Konzentration.

Wenn eine Substanz einem Magnetfeld ausgesetzt ist, zeigt sie in Abhängigkeit von ihrer Suszeptibilität ein bestimmtes Verhalten. Dies ist ein Maß dafür, inwieweit eine Substanz empfänglich für eine Magnetisierung durch ein äußeres Magnetfeld ist. Es gibt vier verschiedene Formen der Suszeptibilität, die sich in ihrer Qualität unterscheiden: Diamagnetismus, Paramagnetismus, Ferromagnetismus und Superparamagnetismus. Als Kontrastmittel für die MRT kommen allerdings nur paramagnetische und superparamagnetische Substanzen in Frage, da diamagnetische Substanzen eine negative Suszeptibilität zeigen und ferromagnetische Substanzen nach Entfernung des äußeren Magnetfeldes eine Restmagnetisierung beibehalten (Schmidt 1987).

3.6.2.1 Paramagnetismus

Paramagnetische Substanzen zeichnen sich durch ungepaarte Elektronen aus. Das durch deren Eigenrotation entstehende magnetische Moment nimmt mit der Anzahl der ungepaarten Elektronen zu, durch Anlegen eines magnetischen Feldes richtet sich dann das magnetische Moment in Richtung des Magnetfeldes aus, so dass es in der Summe zu einer Verstärkung kommt (Weinmann et al. 1991).

Von besonderer Bedeutung ist das dreiwertige Gadolinium (Gd^{3+}) aus der Gruppe der Lanthanide, welches mit sieben ungepaarten Elektronen ein sehr starkes effektives magnetisches Moment aufweist. Der sichtbare Signalanstieg kommt durch die Wechselwirkung der ungepaarten Spins des Kontrastmittels mit den Wasserstoffprotonen des jeweiligen Gewebes zustande. In T1-gewichteten Bildern kommt es zu einer Aufhellung, daher der Name „positives Kontrastmittel“. Ein kompetitiver Effekt dieser Kontrastmittel besteht in einer dosisabhängigen T2-Verkürzung. Durch die Optimierung des verwendeten Kontrastmittels, der Dosis sowie der Sequenz, kann dieser Effekt verbessert werden (Seiderer et al. 1987, Weinmann et al. 1997).

3.6.2.2 Superparamagnetismus

Superparamagnetische Substanzen sind sogenannte Eindomänenpartikel oder auch „Single Domain“ Partikel mit ebenfalls ungepaarten Elektronen. Als eine Domäne bezeichnet man eine Region mit spontaner Magnetisierung. Nach dem Anlegen eines äußeren Magnetfeldes richten sich Eindomänenpartikel mit superparamagnetischen Eigenschaften aus einer ungeordneten Ausrichtung parallel aus. Wird das Magnetfeld abgeschaltet, verteilen sie sich wieder zufällig im Raum. Als MR-Kontrastmittel von Bedeutung sind Eisenoxidpartikel aus der Gruppe der Metalloxide. Generell kommen als superparamagnetische Substanzen Ferrite und Magnetite in Betracht, wobei Magnetite eine Untergruppe der Ferrite sind. Beim Anlegen eines äußeren Magnetfeldes bewirken sie durch ihr sehr großes magnetisches Moment lokale Magnetfeldinhomogenitäten. Die Folge ist eine schnellere Dephasierung der Protonen. Kontrastmittel mit superparamagnetischen Eigenschaften bewirken eine T₂-Verkürzung mit nachfolgender SI-Abnahme in T₂-gewichteten Bildern. Dadurch kommt es zu einer Schwärzung im Bild, man spricht daher auch von „negativen Kontrastmitteln“ (Seiderer et al. 1987; Rumor 1996, Reiser und Semmler 1997, Krietsch 1998).

Im Folgenden wird nur auf die Gruppe der Superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (SPIO) und deren Unterart, den Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Particles (VSOP), näher eingegangen.

3.6.3 Superparamagnetische Eisenoxidpartikel (SPIO) als Kontrastmittel für die MR-Tomographie

Der Begriff SPIO wird für alle in der MR-Tomographie als Kontrastmittel experimentell oder klinisch eingesetzten Superparamagnetischen Eisenoxidpartikel verwendet. Hinsichtlich ihrer Größe und Struktur unterscheidet man: SPIO (Superparamagnetic Iron Oxide Particles, 50-150 nm), ultrakleine-superparamagnetische Eisenoxidpartikel: USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles, um 20 nm) (Taupitz et al. 2003).

Die nur wenige nm großen kristallinen Eisenoxide bilden die Grundlage für den Superparamagnetismus. Da sie in wässriger Suspension aggregieren und in der Folge ausfallen würden, müssen sie mit einer Umhüllung versehen werden. Bei den sehr kleinen Partikeln sind die einzelnen Kristalle separat mit dem Hüllmaterial beschichtet (monokristalline Partikel). Als Hüllmaterial wurden bisher Polymere wie Dextran, Carboxydextran, Albumin, Stärke, oder Polyethylenglycol verwendet. Diese Beschichtung führt zu einer sterischen Stabilisierung der Partikel, eine Aggregation wird verhindert. Eine weitere Möglichkeit der Stabilisierung ist die Beschichtung der Eisenoxid-Kerne mit negativ oder positiv geladenen Substan-

zen. Sie verhindern durch elektrostatische Effekte eine Aggregation. Das Verfahren wird deshalb elektrostatische Stabilisierung genannt (Ifeburre et al. 1998). Als Hüllmaterial können verschiedene niedermolekulare aliphatische Di- oder Polycarbonsäuren oder deren Derivate verwendet werden, wie z.B. Apfelsäure oder Zitronensäure. Die genannten Hüllpolymere haben zusätzlich eine antitoxische Wirkung und bieten eine Identifikationsstruktur für das MPS. Zwei superparamagnetische dextranummantelte Eisenoxidpartikel sind als Kontrastmittel zugelassen: Endorem[®] (Guerbert, Advanced Magnetics, Cambridge, USA) und Resovist S[®] (Bayer-Schering-Pharma, Berlin, Deutschland), welche im MPS der Leber und Milz aufgenommen werden. Endorem[®] und Resovist S[®] haben einen starken T₂-Effekt und führen zur Auslöschung des Signals, wodurch sich nun gesundes und entartetes Gewebe voneinander abgrenzen lassen. Diese Substanzklasse wird auch zur Darstellung von Lymphknoten verwendet, um im Rahmen der Tumordiagnostik das Metastasierungsverhalten mit einer genauen Kontrastierung zwischen gesundem und entartetem Gewebe zu beurteilen (Saini et al. 1987; Reimer und Weissleder 1996, Bonnemain 1998, Muller et al. 1998, Speck 1998).

Eine neue Art von Eisenoxidpartikeln stellt die Substanzgruppe der Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Particles (VSOP) dar. Bei den VSOP sind die Eisenkerne nicht, wie bisher, mit einem Polymer ummantelt, sondern erstmalig mit einem Monomer stabilisiert. Dadurch ergibt sich im Gegensatz zu Polymer-ummantelten Kontrastmitteln von physikalisch-chemischer Seite ein gut definierter Partikelbau. Des Weiteren sind die Eisenkerne in ihrer Größe sehr konstant, sie bewegt sich zwischen 2 bis 5 nm. Der Gesamtdurchmesser kann zwischen 4 bis 10 nm reproduzierbar eingestellt werden. Hinsichtlich ihrer physikalischen und biologischen Eigenschaften zeichnen sich die VSOP infolge ihrer T₁-Relaxationszeitverkürzung durch ein hohes intravaskuläres Signal und infolge der geringen Extravasation durch langanhaltenden Kontrast zwischen Gefäß und Gewebe aus (Taupitz et al. 2000, Schnorr et al. 2002, Wagner et al. 2002). Da es sich bei dem als Hüllmaterial verwendeten Zitrat um eine körpereigene Substanz handelt, sind Sensibilisierungsreaktionen nicht zu erwarten.

3.6.3.1 Relaxationsverstärkende Eigenschaften

Wie alle MR-Kontrastmittel verkürzen auch die Superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (SPIO) gleichzeitig die T₁- und die T₂-Relaxationszeit ihres sie umgebenden Mediums. Zu Beginn ihres Einsatzes als MR-Kontrastmittel wurden sie als sogenanntes „negatives“ Kontrastmittel entdeckt und entwickelt. Der Grund für die Verwendung als negatives Kontrastmittel war die im Vergleich zu den Gadolinium-haltigen Substanzen wesentlich stärkere T₂- und T₂*-verkürzende Wirkung (hohe T₂-Relaxivität) mit entsprechend stark signalminderndem

Effekt, auch in T1-gewichteten Bildern. Messtechnische Limitationen der MR-Tomographen verhinderten die Nutzung der stark T1-verkürzenden Wirkung der SPIO. Bis ca. 1995 verfügten die klinischen Geräte über relativ lange, minimale Echozeiten. Erst Tomographen mit leistungsfähigeren Gradientensystemen machten insbesondere in Gradientenechosequenzen Echozeiten von 5 ms möglich und so den T1-verkürzenden Effekt der SPIO im Bild sichtbar (Knollmann et al. 1998).

Neben der Beschaffenheit der Partikel beeinflusst in vivo auch ihre zelluläre Aufnahme die signalverändernde Wirkung. Zirkulieren die SPIO frei in der Blutbahn oder befinden sie sich frei im Extrazellulärraum, zeigen sie im Wesentlichen die unter in vitro Bedingungen bestimmten Eigenschaften. Demgegenüber kommt es nach intrazellulärer Aufnahme der Partikel, z.B. in den Kupferzellen der Leber oder in den Gliazellen des zentralen Nervensystems, zu einem signalmindernden Effekt (Jordan et al. 1996; Oswald et al. 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Eisenoxidpartikel basieren auf den zuvor beschriebenen VSOPs.

3.7 Verwendete Kontrastmittel

3.7.1 VSOP-C

VSOP-C (C=Citrat) gehört zu der Gruppe der ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (USPIO) mit einem Gesamtdurchmesser zwischen 4 und 10 nm. Ihr Durchmesser sowie die Relaxivitäten können in weiten Grenzen reproduzierbar eingestellt werden (Abb.1). Generell ist zu sagen, dass größere Partikel, mit einem Durchmesser von etwa 50-100 nm, nach intravenöser Injektion rasch von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden. Partikel mit einem Durchmesser unter 20 nm (wie das VSOP-C) zirkulieren bis zu mehrere Stunden im Blut, wodurch sie sich hervorragend als „Blut-Pool“-Kontrastmittel eignen (Tombach et al. 2004). Außerdem haben sie gegenüber den größeren Partikeln eine verstärkte T1-Relaxationszeit verkürzende Wirkung und führen somit zu einem starken Signalanstieg in T1-gewichteten Bildern. Studien haben gezeigt, dass der T1-Relaxationszeit verkürzende Effekt mit abnehmendem Partikeldurchmesser zunimmt (Allkemper et al. 2002). Bisher wurden diese Substanzen an Mäusen, Ratten, Kaninchen und Schweinen bezüglich ihrer Eignung für die MR-Angiographie getestet und bereits am Menschen klinisch geprüft (Wagner et al. 2002).

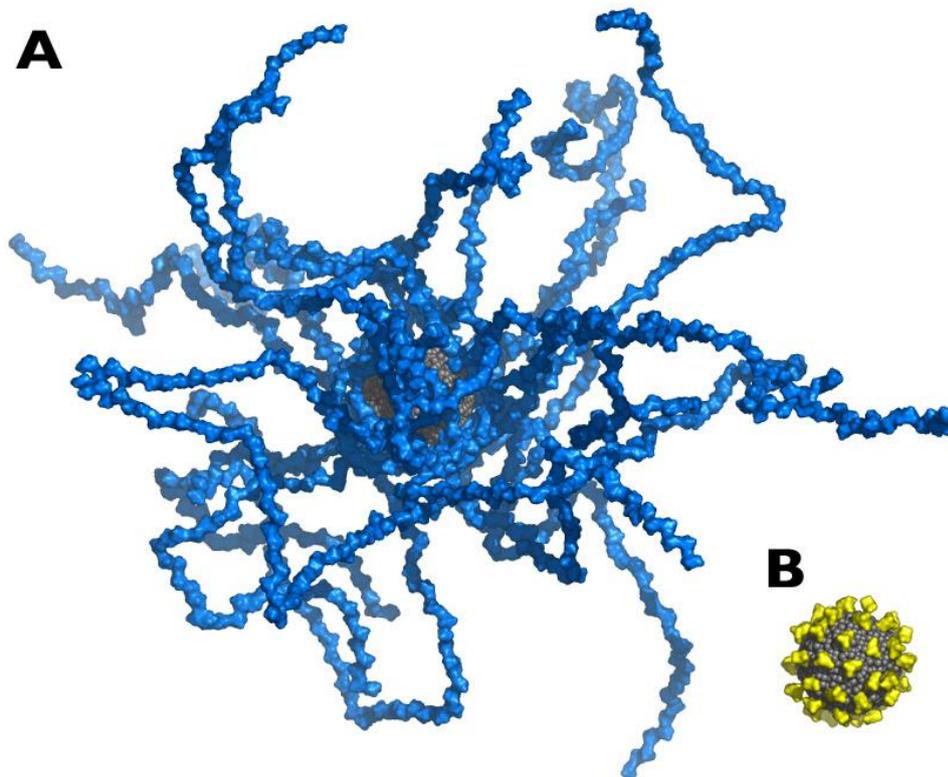


Abb.1: Größenvergleich eines Dextran-umhüllten USPIO Partikel (MION) (A) mit einem Citrat-umhüllten Partikel von VSOP (B). Die polymere Stabilisierung mit dem Polymer Dextran (blau) führt zu einem großen Gesamtpartikeldurchmesser von ca. 20-30 nm. Durch monomere Stabilisierung mit Citrat (gelb) fällt der Gesamtdurchmesser mit ca. 7 nm wesentlich geringer aus (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Schellenberger, Charité Universitätsmedizin Berlin, Deutschland).

3.7.2 VSOP-DOXO

Ein VSOP wurde mit Doxorubicin (Doxo) beladen. Das rotorange kristalline Pulver Doxorubicin gehört zu den Tetrazyklin-Antibiotika aus der Substanzgruppe der Anthrazykline. Doxorubicin wird, aufgrund seiner Toxizität nicht zur Behandlung bakterieller Infektionen, sondern als Zytostatikum zur Behandlung zahlreicher Tumorarten eingesetzt. Hauptsächlich wird es bei fast allen soliden Tumoren wie z.B. beim Wilms-Tumor, Neuroblastom, Ovarial-, Mamma- und Blasenkarzinom, aber auch bei akuten Leukämien und bei Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen verwendet (Henke. 1993).

Die in der Chemotherapie mit Doxorubicin verbundenen akuten Nebenwirkungen umfassen gastrointestinale Störungen, Knochenmarksschädigung, Immunsuppression und Haarausfall.

Des Weiteren ist die Therapie mit Doxorubicin, wie auch mit den anderen Anthrazyklinen, mit einer kumulativen Kardiotoxizität verbunden (Abraham et al. 1996, Shan et al. 1996).

3.7.3 Resovist S[®]

Resovist S[®] (SHU 555 C; Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Deutschland) gehört ebenfalls zu den superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln. SHU-555-C-Eisenoxidpartikel sind die USPIO-Subfraktion des SPIO-Ferucarbotrans (Resovist[®], SHU 555 A). Die SHU-555-C-Partikel bestehen aus einem 3-4 nm großen Fe₂O₃- und Fe₃O₄-Eisenoxidkern und einer Carboxydextranhülle. Der Gesamtdurchmesser liegt zwischen 20 und 30 nm. Resovist S[®] wurde primär für die Lymphknotendiagnostik entwickelt und führt sowohl zu einem Signalverlust auf T2-gewichteten Aufnahmen in normalen Lymphknoten als auch zu einem deutlichen positiven Signaleffekt auf T1-gewichteten Aufnahmen innerhalb von Gefäßen. Dieser T1-Effekt des USPIO Resovist S[®] bei intravasaler Verteilung wurde daher in verschiedenen Studien und Anwendungen für die MR-Angiographie genutzt (Clarke et al. 2000, Tombach et al. 2002, Wacker et al. 2003, Simon et al. 2006). Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine Untersuchungen über das Anreicherungsverhalten von Resovist S[®] in Gehirntumoren.

3.7.4 VSOP-Protamin

Bei dieser Substanz handelt es sich um VSOP-Partikel, die elektrostatisch mit Protamin beladen wurden (Schellenberger et al. 2008). Protamin ist ein kleines basisches Arginin-reiches Kernprotein, welches Histone in der späten haploiden Phase der Spermatogenese ersetzt. Somit gewährleistet es die kompakte Anordnung des Chromatins im Nukleus der Spermien (Reynolds et al. 2005).

In der Pharmazie werden Protamine eingesetzt, um die Freisetzung von Insulin zu verzögern und damit seine Wirkung zu verlängern (NPH-Insuline). Darüber hinaus antagonisieren die Salze des Protamins (z.B. Protaminsulfat und Protaminhydrochlorid) die Wirkung von Heparin und werden deshalb bei einer Überdosierung von Heparin als Antidot eingesetzt (Reynolds et al. 2005).

4 Material und Methoden

Die Untersuchungen an den Versuchstieren werden im Rahmen eines vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt (Genehmigungsnummer: G 0204/05).

4.1 Tumorzellen

Als Zelllinie zur Erzeugung der Tumoren werden die GS-9L-Zellen der Ratte (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK) verwendet.

4.1.1 Kulturbedingungen

Die adhärenz wachsenden Zellen werden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in Kulturflaschen (Falcon, Sarstedt, Newton, USA) mit einer Oberfläche von 25 cm² und Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO, New York, USA), supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FBS) (GIBCO, New York, USA), 4 µM L-Glutamin, 4500 mg Glukose/L, 1500 mg Natriumbikarbonat und 5ml Penicillin/Streptomycin kultiviert (GIBCO, New York, USA). Sobald der Boden der Kulturflasche zu 90% mit Tumorzellen bewachsen ist, werden die Zellen mittels Trypsin-EDTA (GIBCO, New York, USA) von der Kulturoberfläche abgelöst und mit einer Zelldichte von 5 x 10⁴ Zellen pro cm² neu ausgesät.

4.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt durch Färbung mit Trypanblau (GIBCO, New York, USA). 50 µl Zellsuspension wurden mit 450 µl Trypanblau 0,5% 1:10 verdünnt. Ein Aliquot wird unter ein Deckglas auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Lichtmikroskopisch erfolgt dann die Auszählung der lebenden, nicht angefärbten Zellen von vier Quadranten. Ein Quadrant enthält 0,1 µl Zellsuspension.

4.1.3 Passagieren der Zellen

Die Zellen werden passagiert, bevor die vollständige Konfluenz erreicht wird. Bei 100% Konfluenz des Zellrasens kann das Wachstum durch Kontaktinhibition beeinträchtigt werden. Nachdem das Kulturmedium abgesaugt und die Zellschicht mit warmem PBS (GIBCO, New York, USA) gespült ist, werden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (GIBCO, New York,

USA) bedeckt und 3-5 Minuten bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst haben. Um die Wirkung des Trypsins zu inhibieren und die bei zu langer Einwirkzeit des Enzyms auftretende Zellschädigung zu vermeiden, wird zur Zellsuspension mindestens die doppelte Menge serumhaltiges Kulturmedium gegeben und die Zellsuspension homogenisiert, bevor sie in ein Zentrifugenröhrchen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt und bei 1200 Umdrehungen/Minute 5 Minuten bei 23°C abzentrifugiert (Megafuge 400 R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) wird. Die Zellen, die nicht eingefroren werden, werden in DMEM-Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FBS) (GIBCO, New York, USA), 4 µM L-Glutamin, 4500 mg Glukose/L, 1500 mg Natriumbikarbonat und 5ml Penicillin/Streptomycin kultiviert (GIBCO, New York, USA) kultiviert und alle drei Tage 1:4 gesplittet.

Alle Arbeiten erfolgen unter einer sterilen Werkbank (Herasafe 12, Heraeus, Hanau, Deutschland).

4.1.4 Langzeitlagerung und Kryokonservierung der Tumorzellen

Zum Einfrieren der Zellen werden 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen in einem Kryoröhrchen (Falcon, Sarstedt, Newton, USA) in 1 ml Einfriermedium (1 Volumen Dimethylsulfoxid (DMSO) und 9 Volumen Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FKS)) aufgenommen. Die Kryoröhrchen werden umgehend in einen -80°C Tiefkühlschrank verbracht.

4.1.5 Präparation der Zellen für die Implantation

Die Vorbereitung erfolgt wie unter Punkt 4.1.2. beschrieben. Nach dem Zentrifugieren wird das Zellpellet in 2 ml PBS aufgenommen und anschließend in zwei 1,7 ml Eppendorf Tubes überführt. Im Anschluss werden die Tubes zentrifugiert (Tischzentrifuge 54115 D, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wird abgenommen und die Zellen in 10µl PBS resuspendiert. Bis zur anschließenden Implantation werden die Portionen auf Eis gekühlt (Lindl und Gstraunthaler 2008).

4.1.6 Untersuchte Tiere

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 30 männliche Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 200 g des Stammes Fischer 344 (Charles River Laboratories Sulzfeld, Deutschland) verwendet.

4.1.7 Haltung der Tiere

Die Ratten wurden in Makrolonkäfigen in Gruppen von 2-4 Tieren gehalten und erhielten das Standard-Rattenfutter Altromin 1326 der Firma Altromin GmbH & Co KG, Lage, Deutschland und Wasser ad libitum. Als Einstreu in die Käfige wurde Tierstreu der Firma J. Rettenmaier und Söhne GmbH +CO.KG, Rosenberg, Deutschland verwendet. Als Enrichment erhielten die Tiere zusätzlich Zellstoff sowie einen Unterschlupf. Die Käfige befanden sich in klimatisierten Räumen mit gefilterter Frischluft, einer Luftfeuchtigkeit von 40-50% und einer Raumtemperatur von 22°C. Die Beleuchtung war in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus geschaltet.

4.1.8 Implantation der Tumorzellen

Zur Implantation wurden die Tiere zunächst durch eine kurze Isofluran/O₂ Inhalationsnarkose immobilisiert und mit Midazolamhydrochlorid (Dormicum® 5mg/ml, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) s.c., Atropinsulfat (Atropin® 0,5 mg/ml, B.Braun, Melsungen, Deutschland) s.c., Medetomidinhydrochlorid (Domitor®, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) i.m., Fentanylcitrat (Fentanyl®-Janssen 0,5 mg/10ml, Janssen-Cilag GmbH, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) i.m. anästhesiert. Anschließend wurde der Kopf der Tiere an der Oberseite rasiert und die Haut mit Softasept®N (B.Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Die einzelnen Ratten wurden in Brust-Bauchlage in das Stereotaxiegerät (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) eingespannt und mit Hilfe der Ohrstifte und Zahnhalter fixiert. Um eine Auskühlung während des Eingriffes zu vermeiden, lagen die Tiere auf Wärmematten und zum Schutz der Kornea wurde Augensalbe (Regepithel®, Alcon Pharma, Freiburg im Breisgau, Deutschland) aufgetragen. Mit einem Einmalskalpell erfolgte ein ca. 2 cm langer Hautschnitt entlang der Crista sagittalis externa. Die Haut wurde mittels zwei Arterienklemmen beiseite gehalten. Nun wurde teils stumpf, teils mit einer feinen Schere die Galea aponeurotica und das Periost vom Knochen gelöst, um die Schädelnähte zur weiteren Orientierung darzustellen. Mittels eines feinen Bohrers (2 mm Durchmesser) (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) wurde 3 mm rechts lateral und 3 mm anterior zur Kreuzungsstelle der Suturrae interfrontalis und sagittalis (Bregma) die Trepanation vorgenommen (Abb.2 und 3).

Nun erfolgte die Inokulierung der Tumorzellen (ca. 1×10^6 Zellen / 10 µl PBS) mit Hilfe einer am Stereotaxiegerät fixierten Hamilton Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) 3 mm unterhalb der Schädeldecke über einen Zeitraum von 10 Minuten (Abb.3). Nach der Injektion wurde die Haut mit Einzelheften verschlossen. Die Tiere erhielten postoperative Analgesie mit Carprofen (Rimadyl®, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) 5 mg/kg s.c. Zur Un-

terstützung des Kreislaufs wurde den Ratten perioperativ ca. 5-8 ml/Tier Vollelektrolytlösung s.c. injiziert.



Abb.2 Ratte eingespannt in das Stereotaxiegerät, nach dem Hautschnitt (linkes Bild). Der Bohrer durchdringt die Schädeldecke (rechtes Bild).

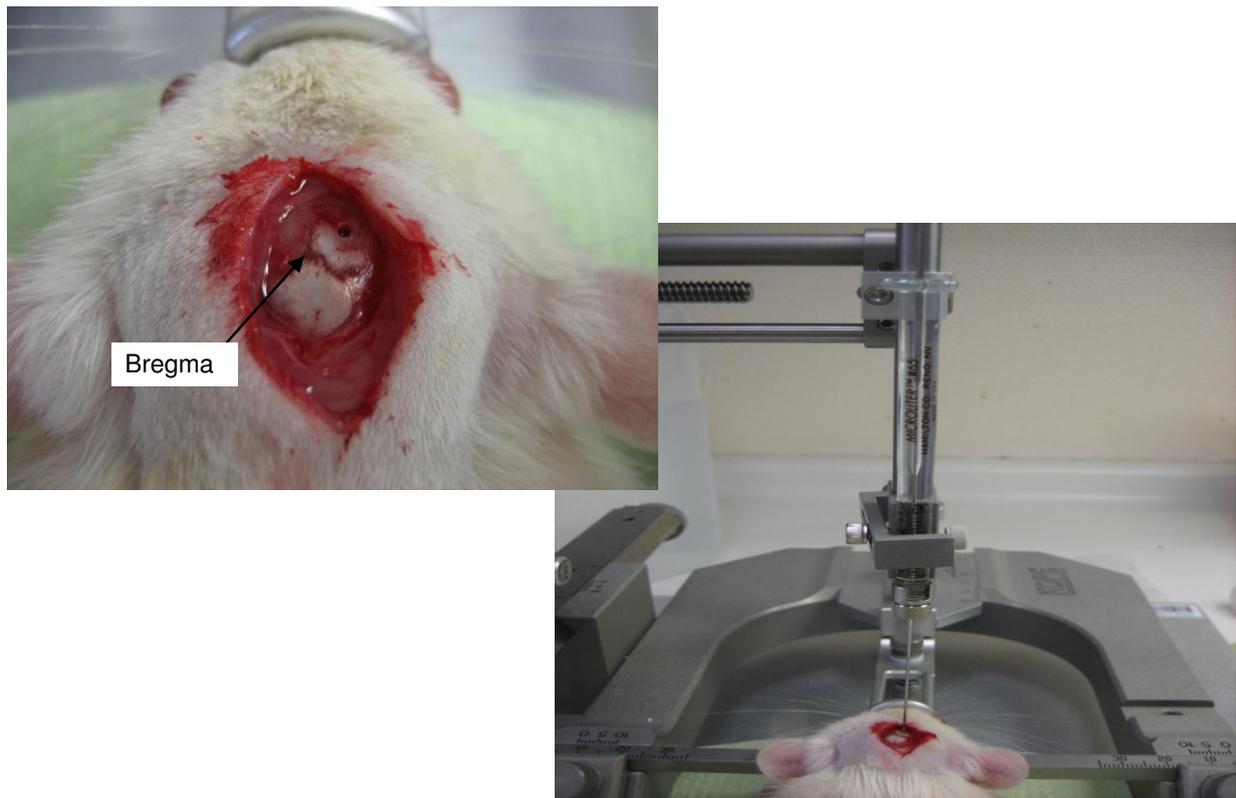


Abb.3: Nach der Trepanation der Schädeldecke ist das Bohrloch 3 mm rechts lateral und 3 mm anterior zur Kreuzungsstelle der Suturæ interfrontalis und sagittalis (Bregma) (Pfeil) deutlich zu erkennen (linkes Bild). An dem Stereotaxiegerät ist eine Hamilton Spritze befestigt. Die Tumorzellen werden implantiert (rechtes Bild).

4.2 Verwendete Kontrastmittel

Für diese Studie wurden vier verschiedene Superparamagnetische Eisenoxidpartikel mit unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften (Tabelle 3) bezüglich ihres Anreicherungsverhaltens im Glioblastom untersucht.

Die Substanzen wurden vor, eine Minute, eine Stunde, zwei Stunden und 24 Stunden nach ihrer Injektion kernspintomographisch untersucht. Die histologische Auswertung erfolgte im Anschluss an die letzte MRT-Messung (24 Stunden nach Injektion der Kontrastmittel). Insgesamt 30 Ratten wurden à 5 Tiere in 6 Gruppen eingeteilt (Tab. 2). Für die intraarterielle Applikation in die Arteria carotis communis erhielten alle Tiere der Gruppe 1 eine Dosis von 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$. Die Tiere der Gruppe 2 erhielten intrazisternal eine Dosis von 25 $\mu\text{mol Fe/kg}$. Die Tiere der Gruppe 4 erhielten eine Dosis von 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$, die Tiere der Gruppen 5 und 6 erhielten eine Dosis von 25 $\mu\text{mol Fe/kg}$ intrazisternal.

Gruppe	Partikel	Injektionsort	Dosierung
Gruppe 1	VSOP-C	i.a.	100 $\mu\text{mol Fe/kg}$
Gruppe 2	VSOP-C	i.z.	25 $\mu\text{mol Fe/kg}$
Gruppe 3	VSOP-DOXO	i.a.	100 $\mu\text{mol Fe/kg}$
Gruppe 4	VSOP-DOXO	i.z.	20 $\mu\text{mol Fe/kg}$
Gruppe 5	Resovist S	i.z.	25 $\mu\text{mol Fe/kg}$
Gruppe 6	VSOP-Protamin	i.z.	25 $\mu\text{mol Fe/kg}$

Tab. 2: Partikelart, Injektionsort und Dosierung innerhalb der verschiedenen Gruppen.

In Tabelle 3 sind die chemikalisch physikalischen Eigenschaften der verwendeten Partikel aufgeführt.

Partikel	Größe (nm)	Relaxivität (ms) R1	Relaxivität (ms) R2	r_2/r_1	Ladung
VSOP-C	7 +/- 0,15	20,1	37,1	1,84	negativ
VSOP- DOXO	6,3 +/- 1	17,3	34,1	1,99	weniger nega- tiv
Resovist S	ca. 20	18	41	2,27	negativ
VSOP- Protamin	ca. 15	19,2	84,6	4,39	positiv

Tab. 3: Chemikalisch / physikalische Eigenschaften der verwendeten Partikel.

Die Relaxivitäten wurden im Relaxometer (Bruker, minispec mq 40, Karlsruhe, Deutschland) bei 0,94 Tesla über die Bestimmung der T1- und T2-Relaxationszeiten ermittelt. Die Relaxivität wird aus dem Anstieg der Relaxationszeiten ermittelt.

Die Größe der Partikel wurde mit dem Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) gemessen.

4.3 Versuchsablauf

Neun Tage nach der Implantation wurden die Tiere in den Versuchsablauf übernommen. Der weitere Verlauf ist in Tabelle 4 dargestellt.

Versuchstag 0	Tumorzellimplantation
Versuchstag 9	MRT Messung mit Injektion
Versuchstag 10	24h MRT Messung und Euthanasie

Tab.4: Zeitplan

4.3.1 Narkose

Zur Immobilisation wurden die Tiere für wenige Minuten in eine Isofluran Box (Fa. Völker GmbH, Kaltenkirchen, Deutschland) gesetzt und erhielten anschließend eine Injektionsnarkose zur Durchführung der Tumorzellimplantation bestehend aus: Midazolamhydrochlorid (Dormicum® 5mg/ml, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) s.c., Atropinsulfat (Atropin® 0,5 mg/ml, B.Braun, Melsungen, Deutschland) s.c., Medetomidinhydrochlorid (Domitor®, Pfizer

GmbH, Berlin, Deutschland) i.m. und Fentanylcitrat (Fentanyl®-Janssen 0,5 mg/10ml, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) i.m.

4.3.2 Untersuchungstechnik

Die MRT-Untersuchungen wurden mit dem 1,5 T Magnetom Sonata (Siemens AG, Erlangen) im Institut für Radiologie, Charité-Universitätsmedizin, Campus Mitte, durchgeführt. Außerdem kam eine herkömmliche Oberarmspule (extremity coil) zum Einsatz.

4.3.3 Positionierung der Ratten

Die jeweils zu untersuchende Ratte wurde in Rückenlage auf ein kleines Schaumstoffkissen zentral in der Oberarmspule gelagert. Die Positionierung erfolgte derart, dass sich der Spulenmittelpunkt auf der Höhe des Gehirns der Tiere befand.

4.3.4 Wahl der Messesequenz

Alle Messungen wurden in axialer Schichtführung aufgenommen. Zur Darstellung des Tumors wurde zunächst eine T2-gewichtete SE-Sequenz mit folgenden Parametern gewählt: Repetitionszeit (TR) = 5050 ms, Echozeit (TE) = 83 ms, Anregungswinkel (α) = 180° , Field of View (FoV) = 80 mm, Matrix = 174 x 192, Voxelgröße = $0,4 \times 0,4 \times 1,0 \text{ mm}^3$. Die Messzeit betrug 12,43 min. Im Anschluss wurde eine T1-gewichtete SE-Sequenz mit folgenden Parametern gewählt: (TR) = 500 ms, (TE) = 13 ms, (α) = 90° , (FoV) = 80 mm, Matrix = 192 x 192, Voxelgröße $0,4 \times 0,4 \times 1,0 \text{ mm}^3$. Die Messzeit betrug 12,52 min. Darauf folgte eine T1-gewichtete GRE-Sequenz mit den Parametern: (TR) = 7,7 ms, (TE) = 3,9 ms, (α) = 25° , (FoV) = 80 mm, Matrix = 192 x 192, Voxelgröße $0,4 \times 0,4 \times 1,0 \text{ mm}^3$. Die Messzeit betrug 11,06 min.

4.4 Applikation der Kontrastmittel

4.4.1 Intraarterielle Applikation

Um den Tieren das Kontrastmittel intraarteriell zu verabreichen, musste zuerst eine Braunüle (24G Neoflon, Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) in die linke Arteria carotis communis der anästhesierten Tiere gelegt werden. Nach einem ca. 4 cm langen Hautschnitt 1

cm rechts der Trachea wurde mittels stumpfer Präparation das Gefäß freigelegt. Nun wurde am caudalen Ende eine Ligatur mit einem Vicryl 3-0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) Faden gesetzt und zwei weitere Ligaturen, vorerst locker, auf Höhe der zu legenden Braunüle angelegt. Im Anschluss wurde die Braunüle kopfwärts in die Arterie eingeführt und mit den beiden zuvor platzierten Ligaturen fixiert. Sodann wurde an die Braunüle eine 35 cm lange Heidelberger Verlängerung (B.Braun, Melsungen, Deutschland) angeschlossen, um die Kontrastmittelapplikation im MRT zu erleichtern. Die Venenverweilkanüle wurde nach der Messung entfernt, das Gefäß mit einer weiteren Ligatur verschlossen und die Wundhöhle gründlich mit Refobacin 10 mg (Merck, Darmstadt, Deutschland) und isotoner 0,9% Natriumchlorid-Lösung (B.Braun, Melsungen, Deutschland) gespült. Die Haut wurde mit Vicryl 3-0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) und Kreuzstichen verschlossen. Die Kontrastmittel VSOP-C und VSOP-DOXO wurden in einer Dosis von 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$ bereits vor der MR-Messung in die Venenverweilkanüle vorgelegt und der Schlauch mit 0,5 ml isotoner 0,9% Natriumchlorid-Lösung aufgefüllt. Unmittelbar vor der ersten KM-Messung wurde das Kontrastmittel mit 0,25 ml isotoner 0,9% Natriumchlorid-Lösung in die Arteria carotis communis appliziert.

4.4.2 Intrazisternale Applikation

Vor der MRT-Messung wurde der Nacken der narkotisierten Tiere rasiert. Nach der Nativmessung wurden die Tiere in Brust-Bauch-Lage gebracht und die rasierte Stelle desinfiziert. Die intrazisternale Applikation der Kontrastmittel erfolgte (suboccipital) in der Mittellinie zwischen dem ersten und dem zweiten Halswirbel mit einer Dosierung von 25 $\mu\text{mol Fe/kg}$, entsprechend 0,04-0,05 ml/Tier.

4.5 Auswertung der MRT-Messungen

Die Auswertung der MRT-Bilder erfolgte mit der Imaging Software OSIRIX open source (The Osirix Foundation, Genf, Schweiz). Die MR-Daten wurden über eine Messung der Signalintensitäten (SI) im Tumor innerhalb einer frei wählbaren Untersuchungsregion ROI (region of interest) ausgewertet. Die Wahl der ROI erfolgte in der Schicht, die den größten Tumordurchmesser zeigte. Es wurden nur die T2-gewichteten Sequenzen ausgewertet, da hier das Anreicherungsverhalten der Nanopartikel am deutlichsten sichtbar war. Die Ergebnisse wurden als SNR-Daten (signal-to-noise, Signal-zu-Rausch-Verhältnis) berechnet. Das Rauschen ist definiert als Signalintensität der Artefakt-freien Luft des Hintergrundes und wurde an einer Stelle neben dem Rattenhirn auf Höhe des Tumors ermittelt (siehe Anhang SNR Berech-

nung). Das SNR wurde berechnet, indem die gemessenen Signalintensitäten durch das Rauschen dividiert wurden ($SNR = SI/R$).

4.6 Histologische Untersuchungen

4.6.1 Entnahme des Gehirns und Vorbereitung für die histologische Untersuchung

Die untersuchten Tiere wurden nach der Messung (24 Stunden) in tiefer Narkose mit T61[®] (Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) getötet. Anschließend erfolgte die Entnahme des Gehirns in folgender Weise: Der Kopf wurde zunächst direkt hinter dem Hinterhaupt vom Rumpf getrennt. Die Kopfhaut wurde nach Durchtrennen mit dem Skalpell stumpf abpräpariert, bis die Kalotte komplett frei lag. Die sich noch am Kopf befindende Nackenmuskulatur wurde entfernt und vom knöchernen Schädel abpräpariert. Anschließend wurde die Kalotte zunächst mit einer Schleifsäge am rechten und linken Rand angesägt und anschließend von occipital nach frontal vorsichtig entfernt. Nach vollständiger Freilegung des Gehirns wurde dieses mit einem stumpfen Spatel vorsichtig und unter Durchtrennung der Hirnnerven aus der Schädelkapsel gelöst (Abb.4). Zur Fixierung wurde das Gehirn über Nacht in 4%ige wässrige Formalinlösung gebracht. Die Gehirne wurden in drei bis vier coronare ca. 0,5 cm dicke Schnitte geschnitten in einem Gewebeeinfiltrationsautomat entwässert und abschließend in Paraffinblöckchen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) eingebettet. Mit einem Rotationsmikrotom (Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden 4-10 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) gebracht und diese dann anschließend in einem Wärmeschrank bei 60°C gelagert.

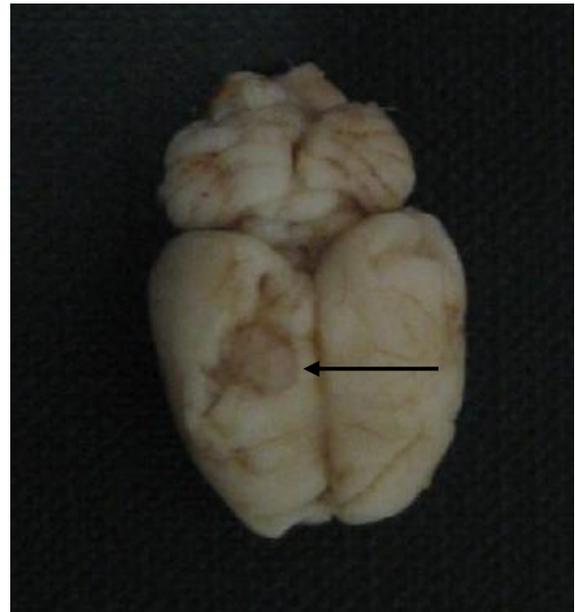
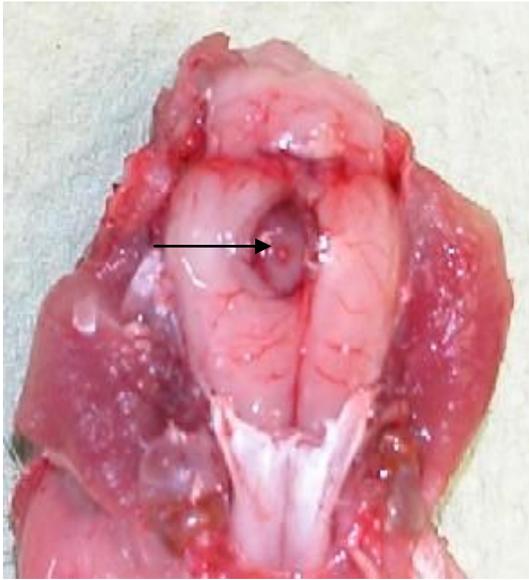


Abb.4: Gehirn vor und nach der Entnahme. Der Tumor ist auf der rechten Gehirnseite zu erkennen (Pfeil).

4.6.2 Histologische Färbungen

Pro Tier wurden jeweils zwei Objektträger mit Hämatoxylin-Eosin (HE) bzw. Berliner Blau gefärbt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte mit der größten Tumorausdehnung zur weiteren Untersuchung verwendet wurden. Die HE-Färbung diente als Standardfärbung zur morphologischen Beurteilung sowie zur Charakterisierung des Tumorgewebes. Sie erfolgte, indem die entparaffinierten Schnitte in Aqua dest. verbracht und anschließend 5-8 Minuten zur Kernfärbung in Hämalaun eingebracht wurden. Nach anschließendem Spülen in Aqua dest. und 10-minütigem Bläuen unter fließendem Leitungswasser wurden sie 5-15 Minuten in Eosin gefärbt. Nun wurden die Präparate in Wasser ausgewaschen, in 80%igem Ethanol geschwenkt und jeweils für 2 Minuten in 96-100%igem Ethanol und 5 Minuten in Xylol verbracht. Anschließend wurden sie mit Histofluid (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) eingedeckelt (Lindl und Gstraunthaler 2008).

Der histochemische Nachweis des dreiwertigen Eisens erfolgte mit der Berliner Blau-Reaktion. Hierbei wird dreiwertiges Eisen blau angefärbt, die Gegenfärbung mit Kernechtrot färbt die Zellkerne rosa-violett. Dazu wurden die entparaffinierten Schnitte durch die Alkoholreihe in Wasser gebracht und 5 Minuten in einer wässrigen Kaliumferrozyanidlösung eingestellt. Im Anschluss wurden sie 30 Minuten in einer Mischung aus gleichen Teilen 20%iger Salzsäure und 10%iger Kaliumferrozyanidlösung eingestellt und ausgewaschen. Nach einer 5-minütigen Gegenfärbung mit Kernechtrot erfolgte eine weitere Spülung in Aqua dest., einer aufsteigenden Alkoholreihe, Xylol und das Einschließen mit Histofluid. Da in dieser Arbeit ein

eisenhaltiges Kontrastmittel verwendet wurde, kann dieses mit der Berliner Färbung dargestellt werden (Lindl und Gstraunthaler 2008).

4.6.2.1 Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Mitoserate der Tumorzellen wurde bei 400-facher Vergrößerung beurteilt. Mit einem Durchmesser von 0,5 mm hatte jedes Gesichtsfeld eine Größe von 0,194 mm². Das Ergebnis wurde in einer Tabelle (siehe Anhang) zusammengefasst. Hierfür wurde ein Lichtmikroskop der Firma Leica (Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Bei der Auszählung der in Teilung befindlichen Tumorzellen wurden als "häufig" pro Sichtfeld drei bis vier und als "vereinzelt" zwei der betreffenden Zellen gewertet (Abb.5).

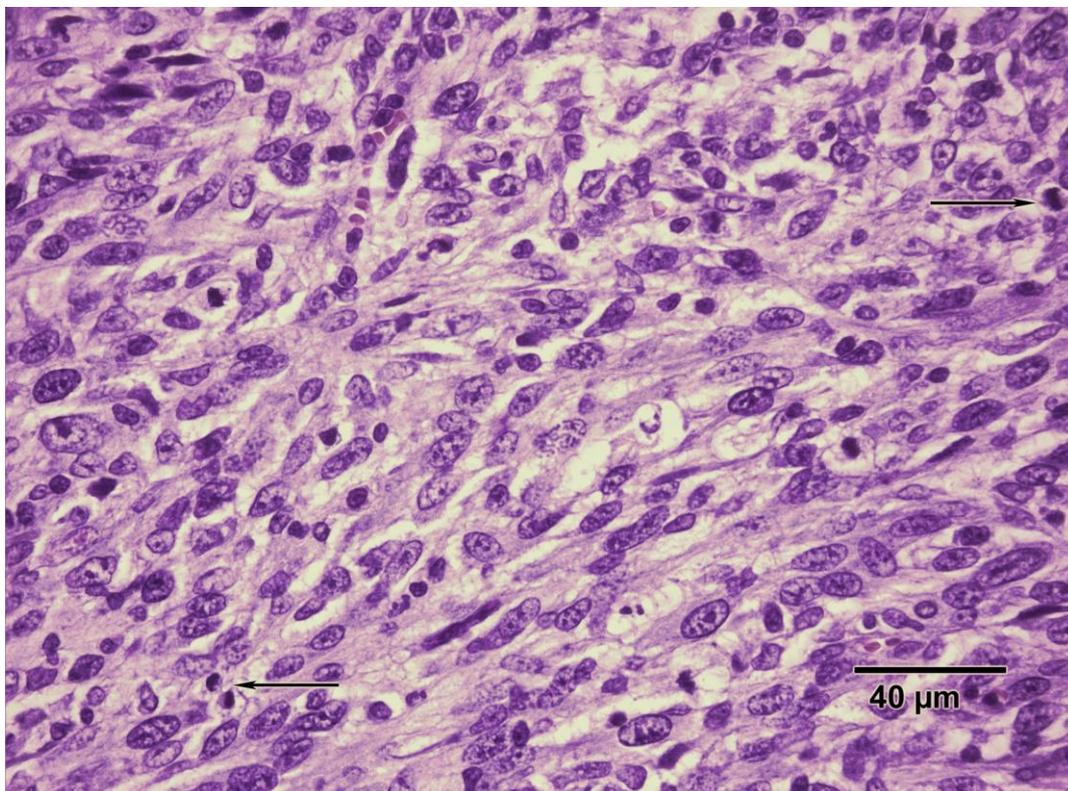


Abb.5: Tumorgewebe mit mitotisch aktiven Tumorzellen (Pfeile). HE-Färbung

4.6.2.2 Auswertung der Berliner-Blau-Färbung

Die blau gefärbten Partikel sind als phagozytierte Eisenrückstände zu bezeichnen (Abb.6).

Die semiquantitative Bestimmung der Eisenlokalisation im Tumor für die einzelnen Gruppen erfolgte nach folgendem Score:

- 0 = kein Eisen nachweisbar
- 1 = wenig Eisen nachweisbar (< 1000 Partikel/Präparat)
- 2 = viel Eisen nachweisbar (> 1000 Partikel/Präparat)

Zur Lokalisation des aufgenommenen Eisens wurde der Tumor in drei Bereiche eingeteilt:

- Tumorzentrum (Gewebebereich, der vom Mittelpunkt des Tumors höchstens 10% des Radius entfernt lag)
- Tumorrand (Gewebebereich, der vom Mittelpunkt des Tumors mindestens 80% entfernt lag)
- Tumorperipherie (In der Nachbarschaft des Tumors im gesunden Gewebe)

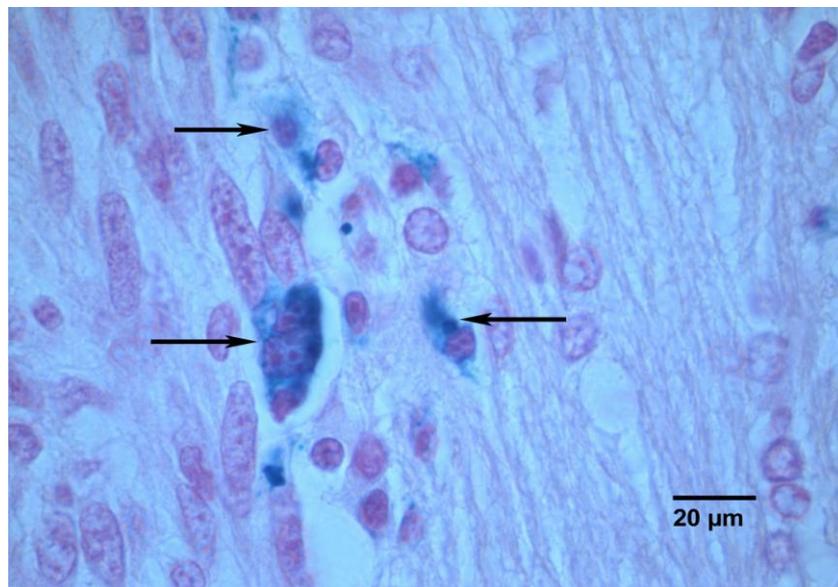


Abb.6: Nach intraarterieller Applikation von VSOP-DOXO. Intrazellulär aufgenommene Eisenpartikel (Pfeile). Berliner Blau-Färbung.

4.7 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms „SPSS“ Version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) und des Kalkulationsprogramms EXCEL (Microsoft, Redmond, USA).

Aufgrund der niedrigen Tierzahl und der damit verbundenen Streuung wurden für die deskriptive statistische Auswertung der quantitativen Daten Box-Whisker Plots gewählt. Mit den Boxplots lassen sich sowohl Median, Quartile, Ausreißer und Extremwerte darstellen. Diese graphische Umsetzung setzt keine Normalverteilung der Messdaten voraus. Die Box wird vom ersten und dritten Quartil (25. bzw. 75. Perzentil) begrenzt, die innere Linie repräsentiert den Median. Ferner werden der kleinste und größte Wert markiert, sofern sie keine Ausreißer sind. Ausreißer (°) sind 1,5-3 Boxenlängen vom oberen bzw. unteren Boxenrand entfernt, während es bei Extremwerten (*) mehr als 3 Boxenlängen sind.

Die Wahl der statistischen Testverfahren richtete sich nach der Fragestellung (Vergleich der Gruppen oder Zeitpunkte) und nach der Beziehung der Merkmale untereinander (abhängig/unabhängig). Der Wilcoxon-Test für abhängige Merkmale, wie der Vergleich unterschiedlicher Messungen bei derselben Gruppe, konnte nicht angewendet werden, da die zu untersuchenden Gruppen lediglich aus fünf Tieren bestanden. Um zwei abhängige Messwerte miteinander zu vergleichen, kann unter bestimmten Voraussetzungen der T-Test angewendet werden. In den vorliegenden Versuchsergebnissen sind die Differenzen nicht normal verteilt, so dass dieser Test hier nur als eine Interpretationshilfe anzusehen ist. Zur graphischen Darstellung der SNR-Werte wurden diese in einem Verlaufsdiagramm dargestellt. Wurden unabhängige Daten der verschiedenen Gruppen miteinander verglichen, kam der Mann-Whitney-Test zum Einsatz. Das Signifikanzniveau wurde mit $p=0,05$ festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Tumorbildung

Nach orthotoper Injektion von Zellen der Zelllinie GS-9L bildeten alle 30 Tiere in der rechten Großhirnhemisphäre Tumoren aus (Tumordurchmesser ca. 5-7 mm). Die Tumoren wuchsen expansiv und invasiv. Bei zwei Tieren fanden sich Tumorausläufer extrazerebral, die übrigen 28 Tumoren blieben streng intrazerebral. Alle Tumoren konnten 9 Tage nach der Implantation im MRT dargestellt werden.

5.2 MRT-Untersuchungen

5.2.1 Morphologische MRT

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine intraarterielle oder eine intrazisternale Applikation der hier untersuchten superparamagnetischen Eisenoxidpartikel zeitabhängige Änderungen der Signalintensitäten in der MRT in den experimentell erzeugten Glioblastomen der Ratte hervorrufen. Unterschiedliche Sequenzen (SE, GRE) sowie T1- und T2-Wichtungen wurden gewählt.

In der T1-gewichteten Präkontrastaufnahme lassen sich die Kontur des Gehirns gut, die Tumoren jedoch nicht, oder nur schwach hypointens darstellen (Abb.7). In den nativen T2-gewichteten Sequenzen stellen sich die Tumoren bei allen 30 Tieren hyperintens im Vergleich zum normalen Gewebe dar (Abb.8). Die Tumoren erscheinen oval, mit einem Durchmesser zwischen 4-7 mm.

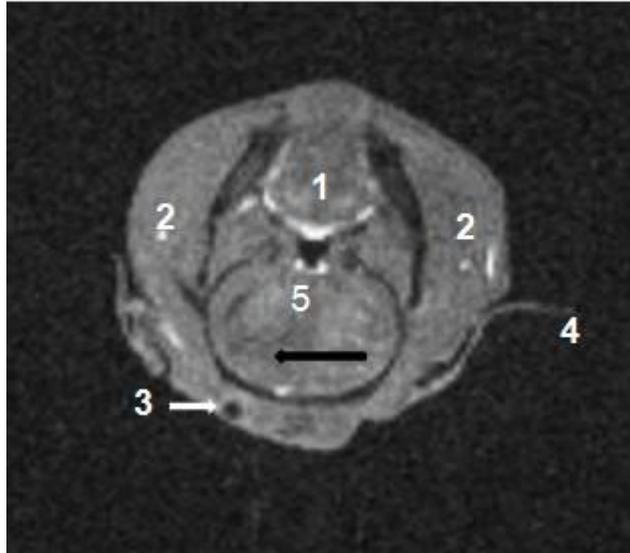


Abb.7: MRT-Bild eines Rattenkopfes in axialer Orientierung. T1-gewichtete GRE-Sequenz. 1: Gewebe des weichen Gaumens. 2: Wangenmuskulatur. 3: Schädeldecke mit Bohrloch (weißer Pfeil). 4: Ohrmuschel. 5: Der Tumor ist in der rechten Großhirnhälfte als undeutlicher hypointenser Bereich zu sehen (schwarzer Pfeil).

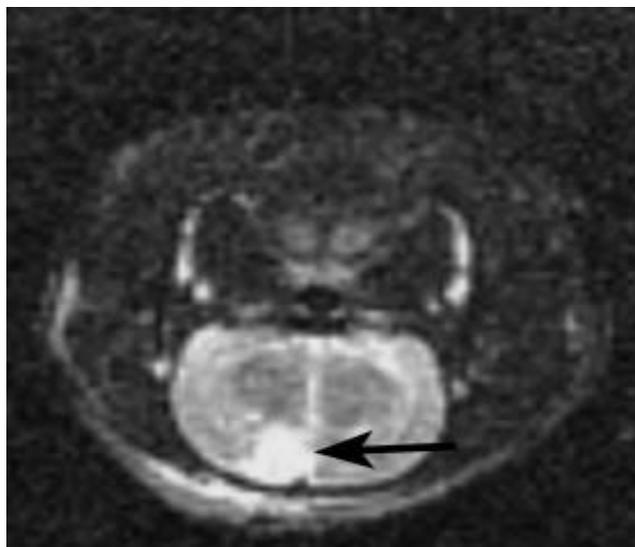


Abb.8: MRT-Bild eines Rattenkopfes in axialer Orientierung, T2-gewichtete SE-Sequenz. Der Tumor ist hier deutlich auf der rechten Großhirnhälfte als hyperintense Struktur zu sehen (Pfeil).

5.2.2 MRT mit VSOP

Abbildung 9 zeigt auf der linken Seite eine T2-gewichtete MRT-Aufnahme eines Rattenkopfes in axialer Schnitfführung. Der Tumor erscheint hyperintens gegenüber dem gesunden Gehirn. Eine deutliche Schwärzung im Bereich des Tumors ist nach der Applikation eines eisenhaltigen Kontrastmittels (Resovist S[®]) auf der rechten MRT-Aufnahme zu sehen.

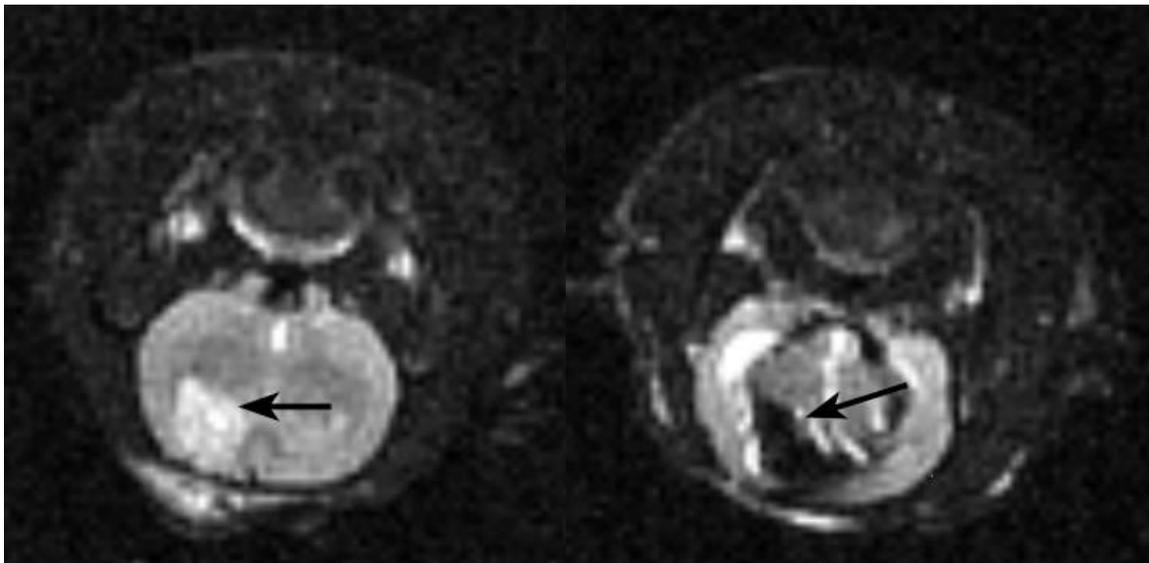


Abb.9: Zwei T2-gewichtete MRT-Aufnahmen eines Rattenkopfes in axialer Schnitfführung. Der Tumor stellt sich auf dem linken Bild weiß gegenüber dem Gehirn dar (Pfeil). 24 Stunden nach der intrazisternalen Injektion von Resovist S[®] ist eine Schwärzung im Bereich des Tumors durch das Kontrastmittel zu sehen (Pfeil, rechtes Bild).

Die folgenden Darstellungen zeigen das Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Tumor zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion der Eisenoxidpartikel.

Die erste MR-Messung (1) erfolgt als Leeraufnahme vor der Injektion der Kontrastmittel, die zweite (2) nach einer Minute, die dritte (3) nach einer Stunde, die vierte (4) nach zwei Stunden und die fünfte (5) nach 24 Stunden. Durch die Messung der Signalintensitäten und das Berechnen des SNR-Verhältnisses kann ein Rückschluss auf die Anreicherung der Eisenoxide zu den verschiedenen Zeitpunkten im Tumor gezogen werden. Aufgrund der zu geringen Unterschiede in den Signalintensitätsänderungen vor und nach Kontrastmittelapplikation und der dafür zu geringen Anzahl von Tieren in einer Gruppe wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

5.2.2.1 Intraarterielle Applikation

VSOP-C

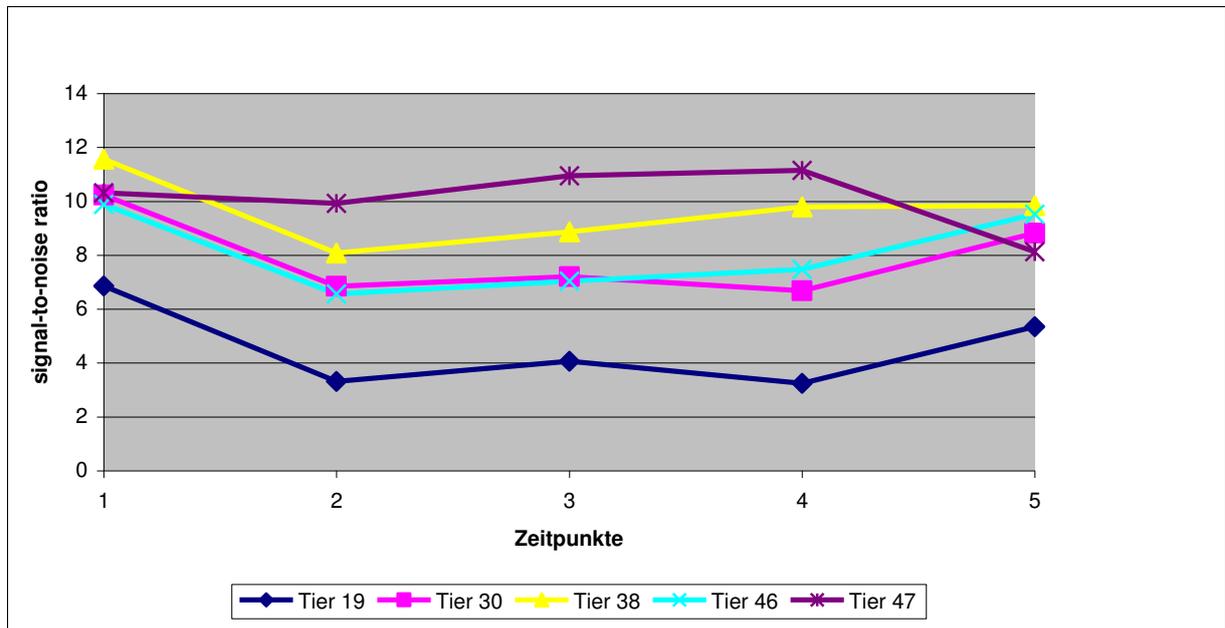


Abb.10: Verlauf der Signal-zu-Rausch (SNR) Verhältnisse im Tumor nach intraarterieller Gabe von 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$ VSOP-C. Dargestellt sind die SNR-Kurven für jedes Tier der Gruppe 1 in Abhängigkeit von der Zeit (1 = Leeraufnahme, 2 = 1 min, 3 = 1 h, 4 = 2 h, 5 = 24 h).

Abbildung 10 zeigt einen maximalen SNR-Abfall bei den Tieren 19, 30, 38 und 46 eine Minute nach der intraarteriellen Injektion von VSOP-C zwischen 30% und 51%. Bei Tier 47 liegt der maximale SNR-Abfall bei 21% 24 Stunden nach der Injektion. Eine Stunde nach Injektion steigt das SNR bis zu dem Zeitpunkt 5 bei 4 von 5 Tieren dieser Gruppe.

VSOP-DOXO

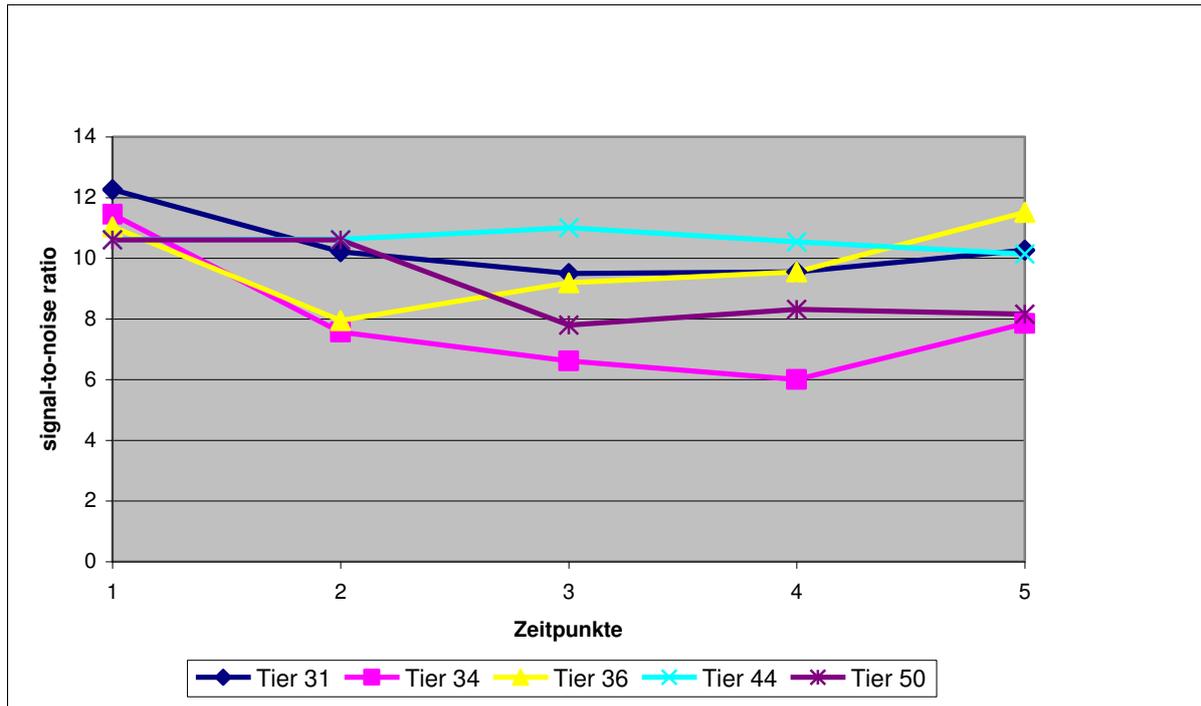


Abb.11: Verlauf der Signal-zu-Rausch Verhältnisse (SNR) im Tumor nach intraarterieller Gabe von 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$ VSOP-DOXO. Dargestellt sind die SNR-Kurven für jedes Tier der Gruppe 3 in Abhängigkeit von der Zeit (1 = Leeraufnahme, 2 = 1 min, 3 = 1 h, 4 = 2 h, 5 = 24 h).

In Abbildung 11 liegt der maximale SNR-Abfall bei den Tieren 31 und 50 zwischen 22% und 26% eine Stunde nach der intraarteriellen Injektion von VSOP-DOXO, während er bei Tier 34 zwei Stunden nach der Injektion bei 47% liegt. Zum Zeitpunkt eine Minute nach der Injektion besteht der maximale SNR-Abfall bei Tier 36 bei 27%. Das SNR bei dem Tier 44 zeigt über den gesamten Zeitraum keine Änderung und fällt maximal um 5% 24 Stunden nach Injektion. Auch in dieser Gruppe steigen die SNR Werte am Ende der Messung wieder an.

5.2.2.2 Intrazisternale Applikation

VSOP-C

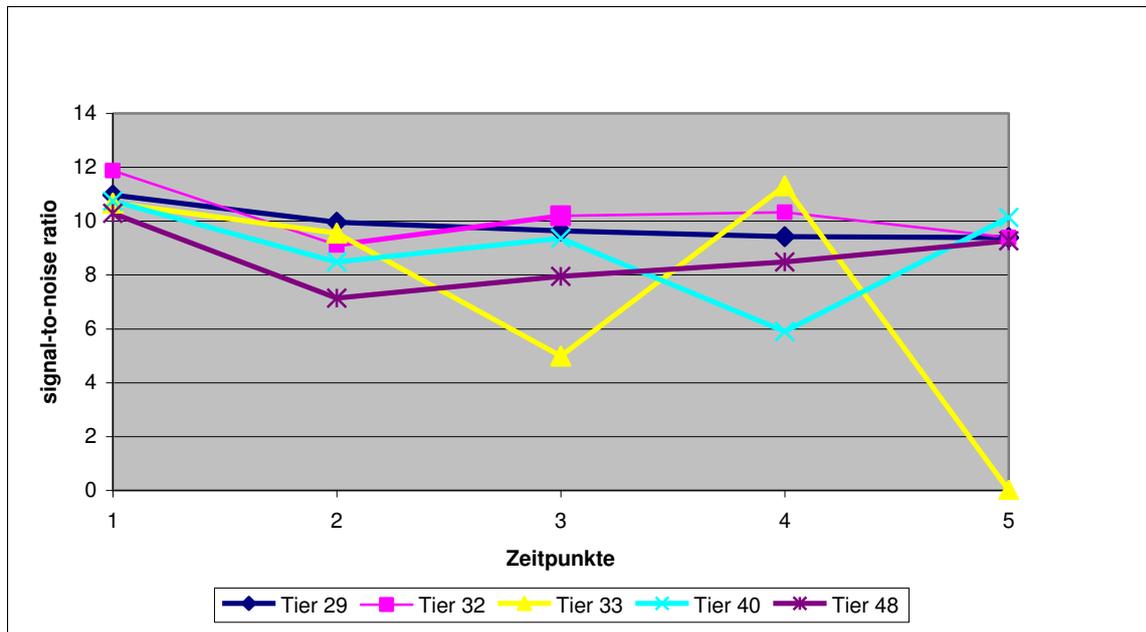


Abb.12: Verlauf der Signal-zu-Rausch Verhältnisse (SNR) im Tumor nach intrazisternalen Gabe von 25 $\mu\text{mol Fe/kg}$ VSOP-C. Dargestellt sind die SNR-Kurven für jedes Tier der Gruppe 2 in Abhängigkeit von der Zeit (1 = Leeraufnahme, 2 = 1 min, 3 = 1 h, 4 = 2 h, 5 = 24 h).

Der Verlauf des SNR in Abbildung 12 zeigt einen maximalen Abfall 24 Stunden nach der intrazisternalen Injektion von VSOP-C bei Tier 29 um 14%. Der SNR-Abfall bei den Tieren 32 und 48 liegt bei maximal 23% bzw. 30% eine Minute nach der Injektion. Tier 33 erreicht den maximalen SNR-Abfall eine Stunde nach der Injektion mit 53%, der Abfall auf den Nullwert bei der letzten Messung ist als Messfehler zu betrachten, bedingt durch einen Artefakt in diesem Bild. Das SNR fällt um maximal 45% zwei Stunden nach der Injektion bei Tier 40. Nach Beendigung der Messung liegen die einzelnen SNR Werte sehr nah an den Ausgangswerten.

VSOP-DOXO

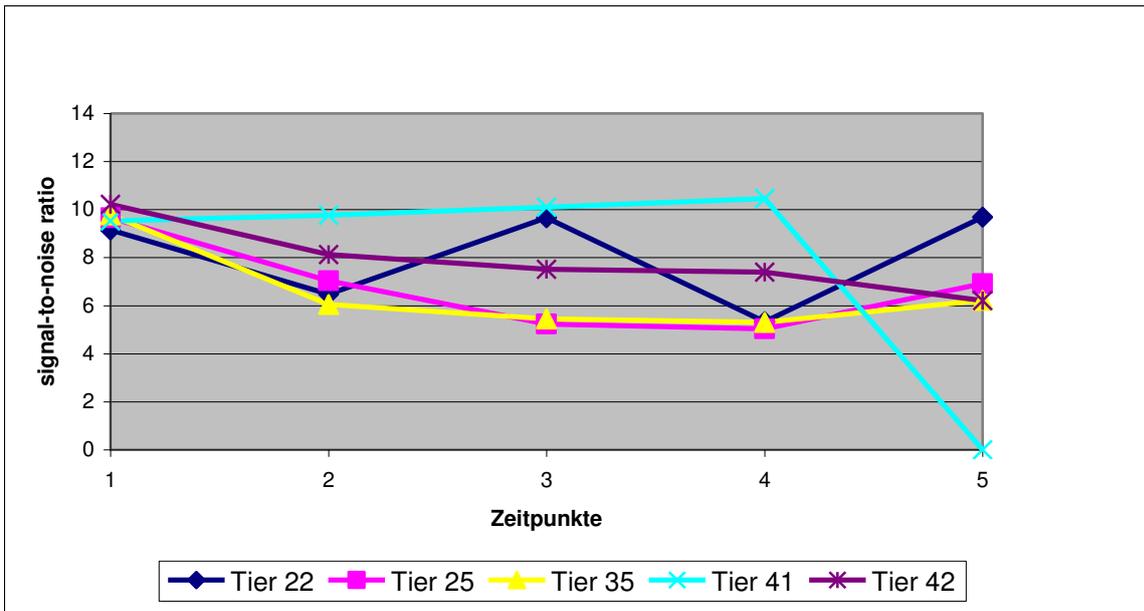


Abb.13: Verlauf der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (SNR) im Tumor nach intrazisternalen Gabe von 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$ VSOP-DOXO. Dargestellt sind die SNR Kurven für jedes Tier der Gruppe 4 in Abhängigkeit von der Zeit (1 = Leeraufnahme, 2 = 1 min, 3 = 1 h, 4 = 2 h, 5 = 24 h).

Abbildung 13 zeigt den Verlauf des SNR mit einem maximalen Signalabfall zwei Stunden nach der intrazisternalen Injektion von VSOP-DOXO zwischen 41% und 47% bei den Tieren 22, 25 und 35. Am Ende der Messungen liegt der SNR Wert bei Tier 22 höher als beim Ausgangswert. Tier 41 zeigt keine Signaländerungen bis zum Zeitpunkt 4, um anschließend auf den Nullwert zu fallen. Auch hier kommt es zu einem Artefakt im Bild.

Resovist S[®]

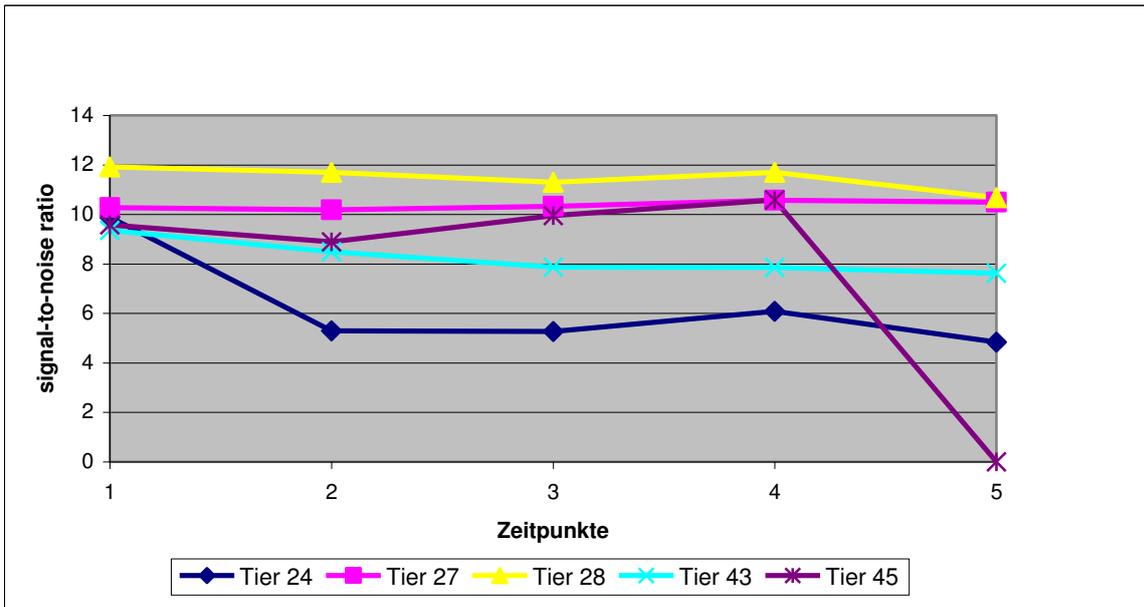


Abb.14: Verlauf der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (SNR) im Tumor nach intrazisternalen Gabe von 25 µmol Fe/kg Resovist S[®]. Dargestellt sind die SNR-Kurven für jedes Tier der Gruppe 5 in Abhängigkeit von der Zeit (1 = Leeraufnahme, 2 = 1 min, 3 = 1 h, 4 = 2 h, 5 = 24 h).

Abbildung 14 zeigt keine Änderung des SNR bei Tier 27. Der maximale SNR-Abfall bei Tier 28 liegt bei 10%, bei Tier 43 bei 18% 24 Stunden nach der intrazisternalen Injektion von Resovist S[®], bei Tier 24 liegt er bei 46 % eine Stunde nach der Injektion der Eisenoxide. Bei Tier 45 fällt das SNR lediglich nach einer Minute um 8%, steigt im weiteren Verlauf wieder an und fällt anschließend auf den Nullwert, bedingt durch einen Artefakt in diesem Bild.

VSOP-Protamin

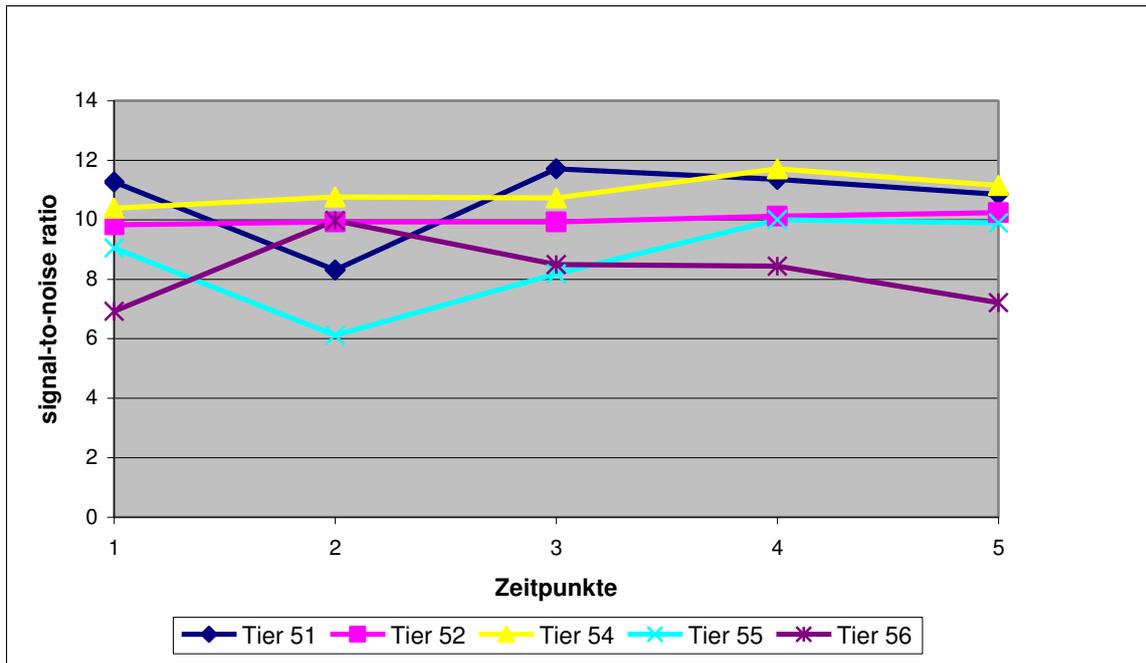


Abb.15: Verlauf des Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (SNR) im Tumor nach intrazisternaler Gabe von 25 $\mu\text{mol Fe/kg}$ VSOP-Protamin. Dargestellt sind die SNR Kurven für jedes Tier der Gruppe 6 in Abhängigkeit von der Zeit (1 = Leeraufnahme, 2 = 1 min, 3 = 1 h, 4 = 2 h, 5 = 24 h).

In Abbildung 15 zeigen die Tiere 51 und 55 einen maximalen SNR-Abfall von 26 bzw. 32% eine Minute nach der intrazisternalen Injektion von VSOP-Protamin. Demgegenüber ist bei Tier 56 zunächst ein Anstieg des SNR zu verzeichnen. Zum Zeitpunkt 5 fällt das SNR wieder auf den Ursprungswert zurück. Bei den übrigen Tieren dieser Gruppe lässt sich keine messbare Änderung der SNR feststellen.

5.2.3 Vergleich der Gruppen zu den 5 Messpunkten

Um die Unterschiede der einzelnen Modifikationen der Eisenoxidnanopartikel bei der Anreicherung im Tumorgewebe zu vergleichen, wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der 6 Gruppen zu jeweils einem Zeitpunkt von den 5 Messpunkten nach Eisenoxid-Applikation miteinander verglichen.

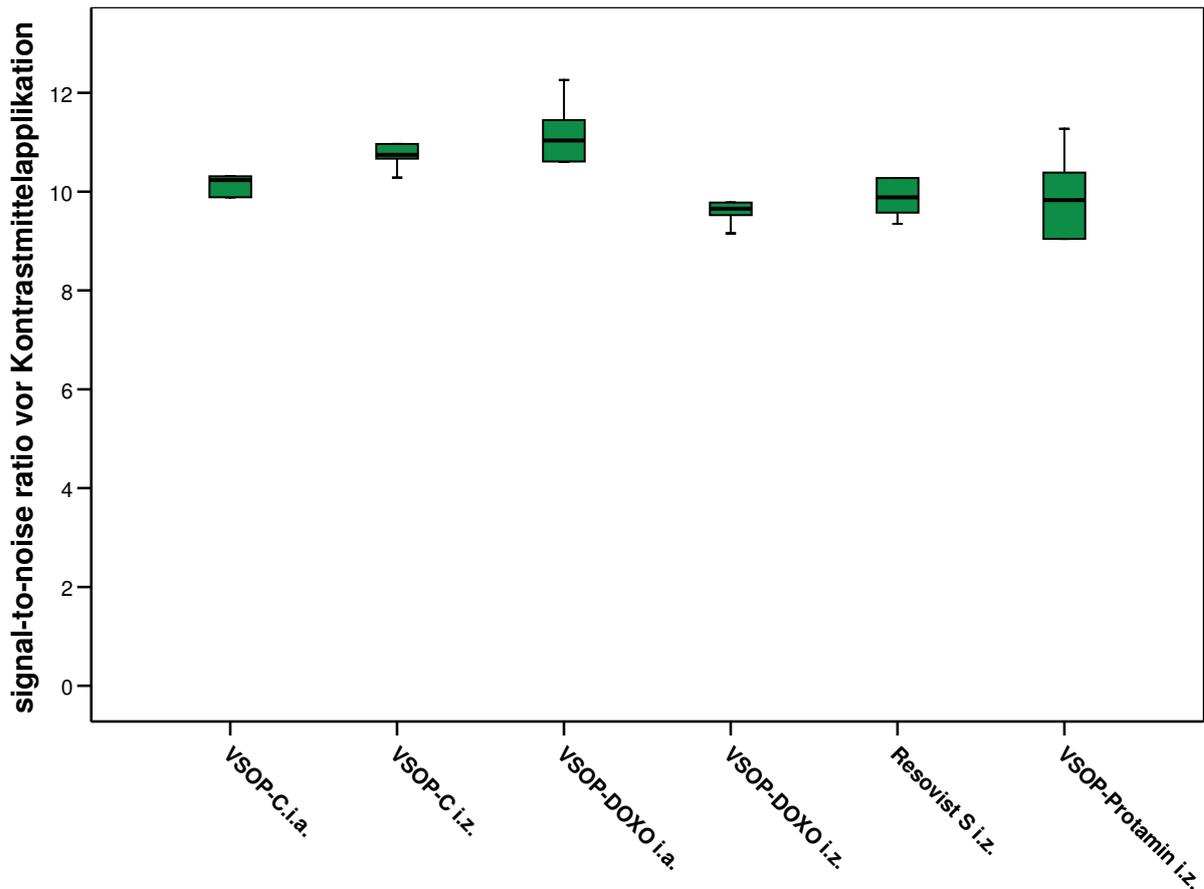


Abb.16: Vergleich der sechs untersuchten Gruppen (Nanopartikel und Injektionsart) zur Darstellung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses zum Zeitpunkt vor der Applikation.

In Abbildung 16 zeigt sich, dass die Leerwerte (vor Kontrastmittelapplikation) der einzelnen Gruppen um den Wert 10 liegen und auch innerhalb einer Gruppe die Leerwerte nicht identisch sind.

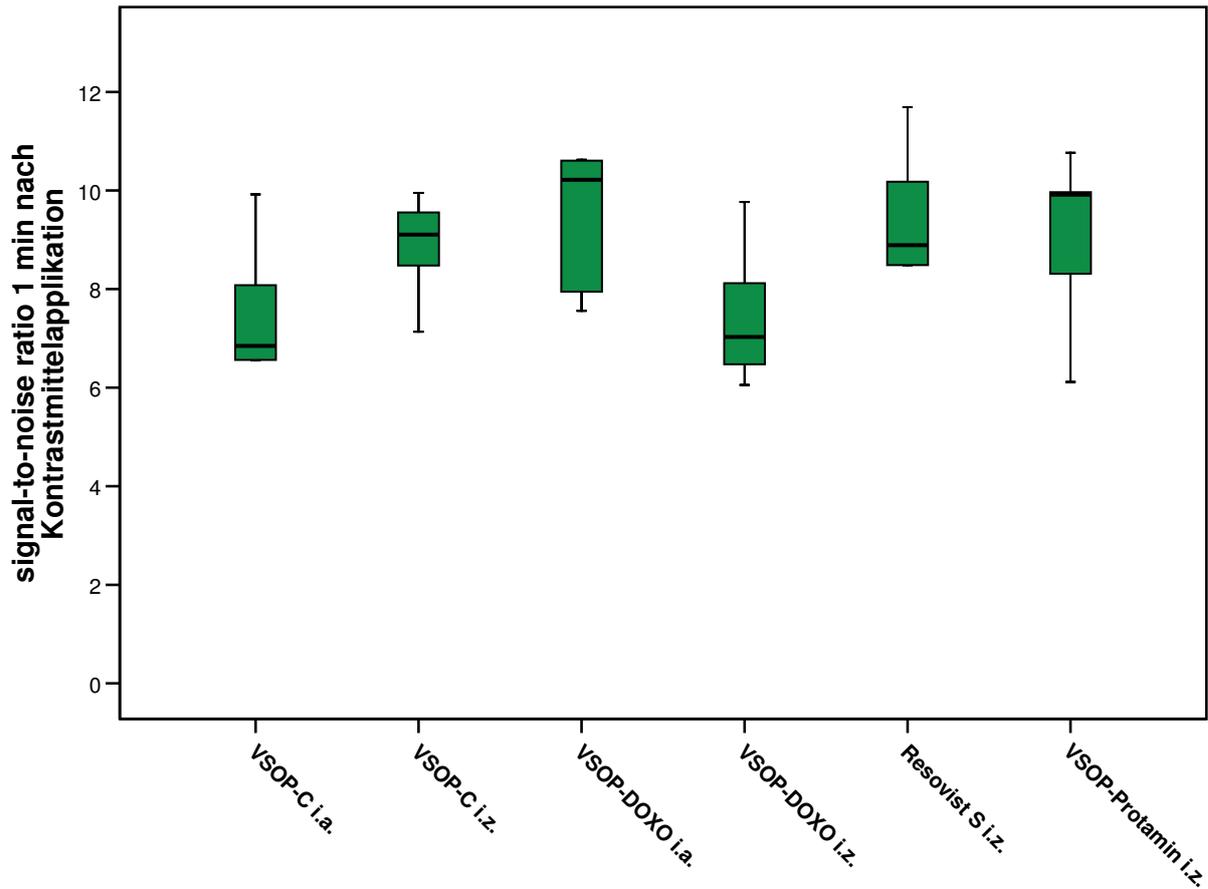


Abb.17: Darstellung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses 1 Minute nach der Kontrastmittelapplikation für alle 6 Gruppen.

Abbildung 17 zeigt die SNR-Werte der 6 Gruppen zum Messzeitpunkt 1 Minute nach der Injektion. Die SNR-Werte der Gruppen unterscheiden sich zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant. Die intraarterielle Injektion von VSOP-C und die intrazisternale Injektion von VSOP-DOXO haben insgesamt niedrigere SNR-Werte als die anderen vier Gruppen. Innerhalb der Gruppen streuen die Einzelwerte so stark, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gibt.

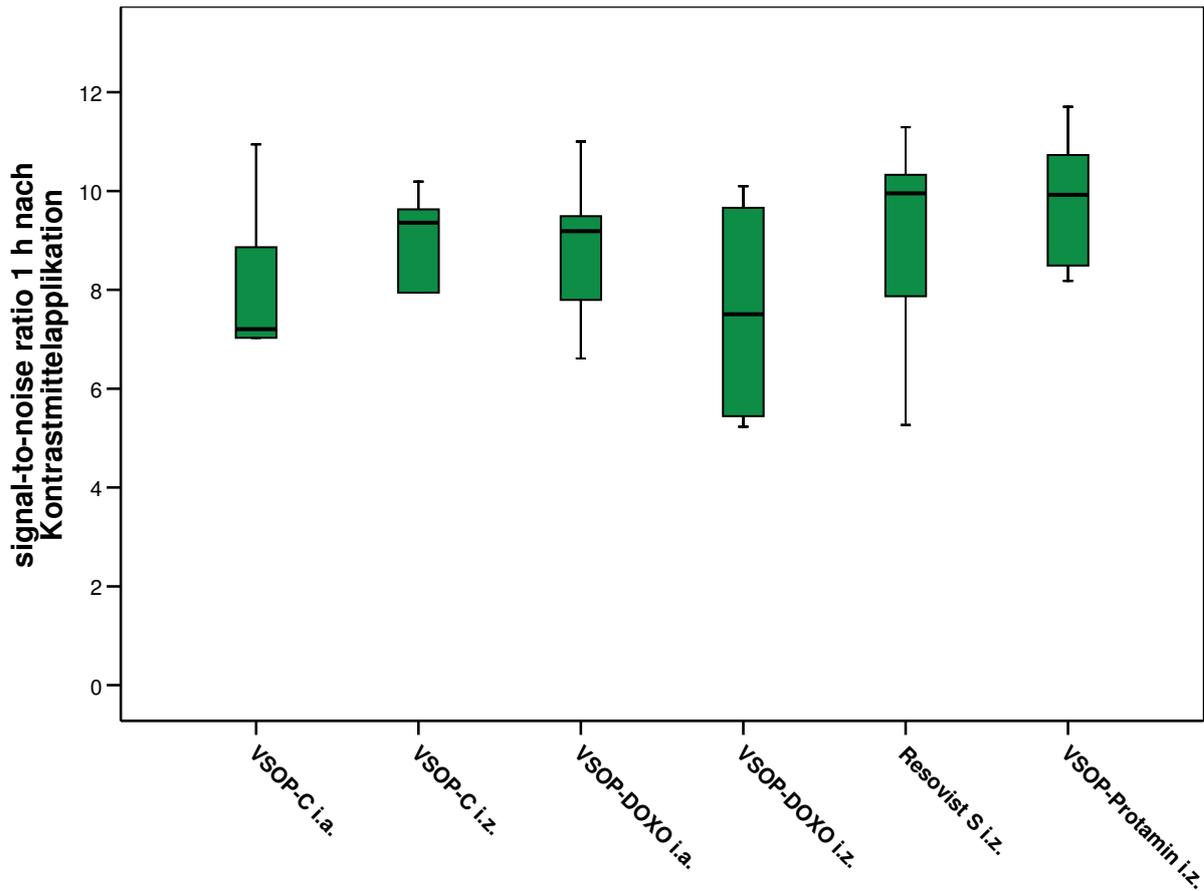


Abb.18: Darstellung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses 1 Stunde nach der Kontrastmittelapplikation für alle 6 Gruppen.

In Abbildung 18 sind die SNR-Werte der 6 Gruppen 1 Stunde nach Applikation der superparamagnetischen Eisenoxidpartikel dargestellt. Es ergibt sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Zu diesem Zeitpunkt sind die geringen Unterschiede vom Zeitpunkt 1 Minute nach Injektion noch geringer und die Streuungen in den Gruppen relativ groß.

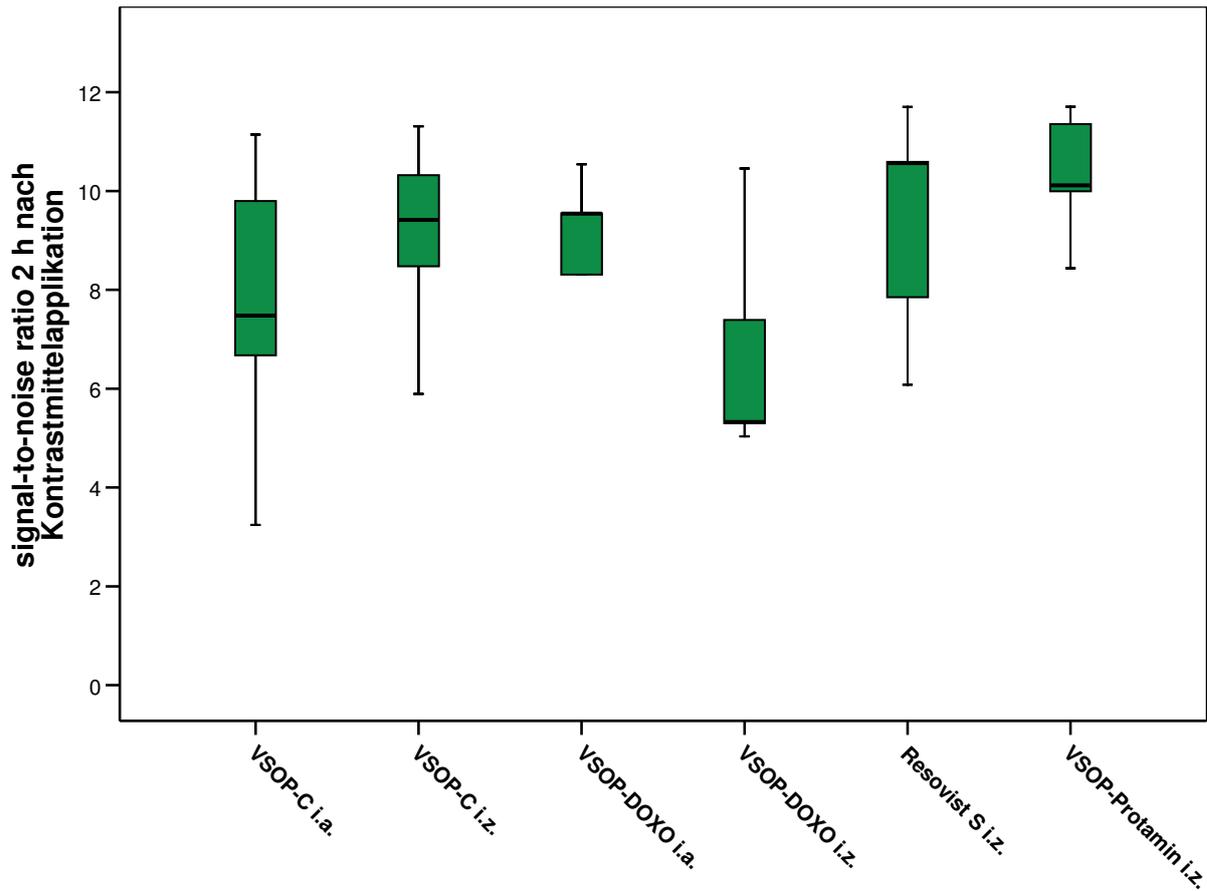


Abb.19: Darstellung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses 2 Stunden nach der Kontrastmittelapplikation für alle 6 Gruppen.

Zum Zeitpunkt 2 Stunden nach Injektion kann man in Abbildung 19 sehen, dass in der Gruppe von VSOP-DOXO mit der intrazisternalen Injektion der Median deutlich unter 10 liegt. Durch die geringe Zahl an Tieren und der Streuung in der Gruppe sind die Unterschiede nicht signifikant. Auch der Median der VSOP-C Gruppe liegt noch unter den anderen Gruppen, aber die Streuung innerhalb der Gruppe ist sehr groß.

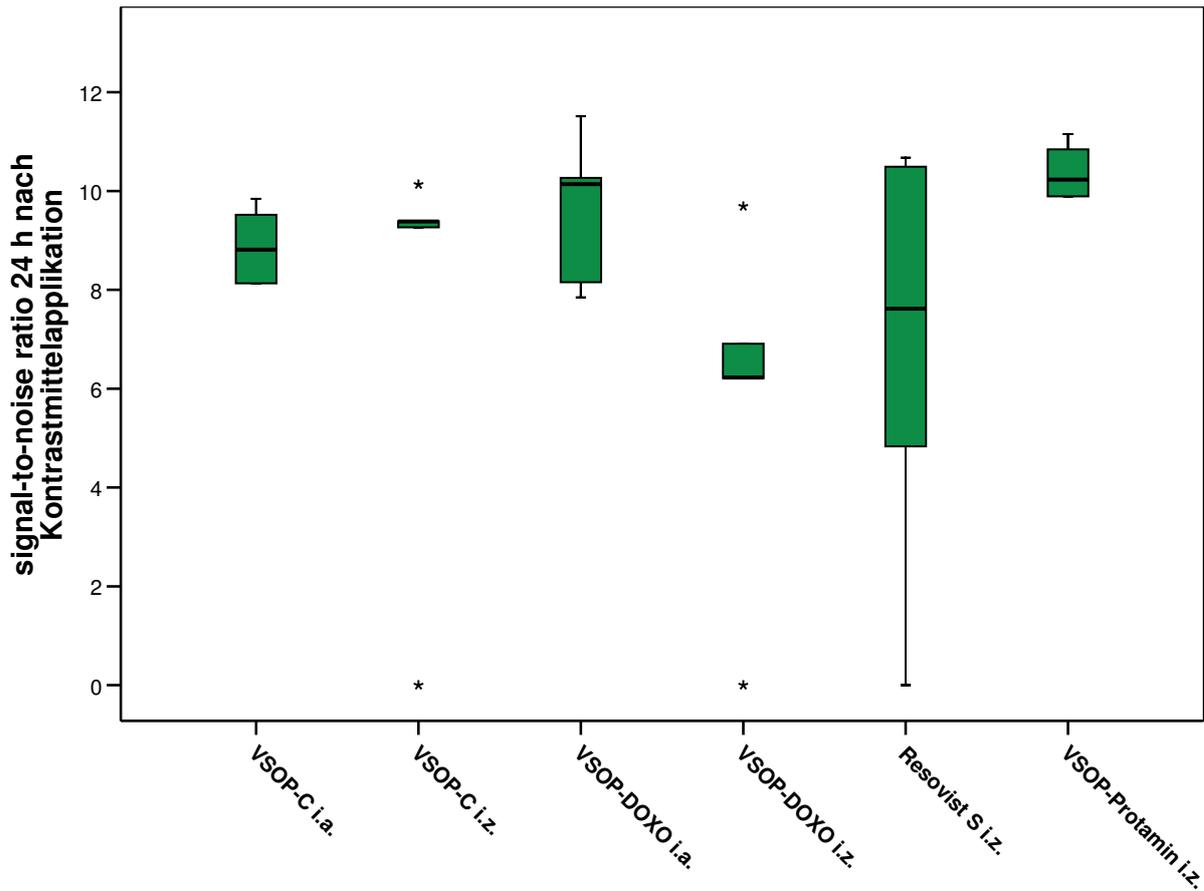


Abb.20: Darstellung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses 24 Stunden nach Kontrastmittelapplikation für alle 6 Gruppen.

In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass außer bei den Gruppen VSOP-DOXO i.z. und Resovist S die SNR-Werte sich wieder in dem Ausgangsbereich um 10 befinden. Das bedeutet, dass es bei den anderen getesteten Substanzen zu keiner Anreicherung von Nanopartikeln kommt, die im MRT detektiert werden können. In der Gruppe von Resovist S ist die Streuung zu groß, um eine Aussage treffen zu können. In der VSOP-DOXO i.z. Gruppe kann man eine Tendenz erkennen, dass es sich hier um eine geringe Anreicherung von Nanopartikeln im Gegensatz zu den anderen Gruppen handeln kann.

5.3 Histologische Untersuchungen

5.3.1 Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

In den histologischen Präparaten ist das Glioblastom im rechten Frontallappen der Ratte deutlich zu erkennen. Bei der HE-Färbung stellen sich die Zellkerne durch die Bindung des Hämatoxylins an das basophile Chromatin dunkelblau dar. Die zytoplasmatischen Proteine werden durch Salzbildung der Eosinanionen mit den positiven Proteingruppen rot angefärbt. In allen angefertigten HE-Schnitten grenzte sich das Tumorgewebe deutlich vom vitalen Gehirngewebe ab. Das zellreiche Tumorgewebe besteht aus fusiformen, polygonalen, runden Zellen variabler Größe. Vereinzelt finden sich Nekrosen mit glialen Pseudopalisaden und vaskuläre Proliferationen. Im Tumorrandbereich sind Anhäufungen von mononukleären Entzündungszellen sichtbar. Bei einigen Präparaten zeigen sich Gefäßeinbrüche am Tumorrand. Die Tumorkapsel ist an vielen Stellen durchbrochen, wodurch Tumorzellen in das umliegende Gehirnparenchym auswandern. Die vitalen Tumorzellen weisen eine verschobene Kern-Plasma-Relation zugunsten der Zellkerne auf. Bei drei Tieren ist ein Tumorwachstum bis in die Kortexstrukturen und die Meningen zu beobachten (Abb.21, Pfeil).

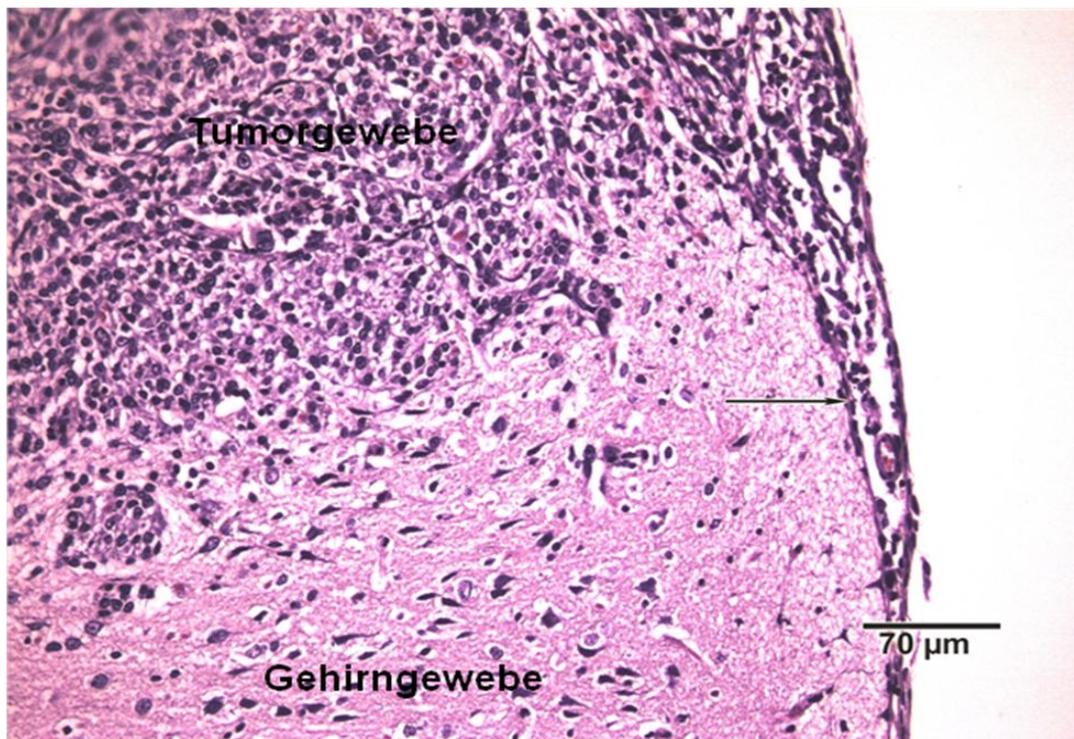


Abb.21: Tumorzellinfiltration in die Meningen (Pfeil). HE-Färbung

Die Beurteilung der Mitoserate ergab bei 21 von 30 Schnitten häufige und bei neun Schnitten vereinzelte Mitosen. Bei allen 30 Tieren war neun Tage nach der Tumorzellimplantation ein

Tumor im MRT nachweisbar. Dieser kurze Zeitverlauf, sowie die gesteigerte Mitoserate sprechen für die Malignität des Tumors.

5.3.2 Auswertung der Berliner-Blau-Färbung zur Eisenlokalisation

Ausgewertet wurden insgesamt 30 Schnitte. Auf zellulärem Niveau zeigen sich die unterschiedlich großen Eisenpartikel phagozytiert, vorwiegend als unvollständiger Randsaum am Tumor (Abb.22 und 23). Häufig sind fadenförmige Ablagerungen perivaskulär oder an der Fissura longitudinalis zu finden (Abb.24, 25 und 26). Da keine spezifische Makrophagenfärbung angefertigt wurde, kann über die Zellart, die die Partikel aufgenommen hat, nur spekuliert werden. Die Partikel befinden sich jedoch eindeutig intrazellulär (Abb.27).

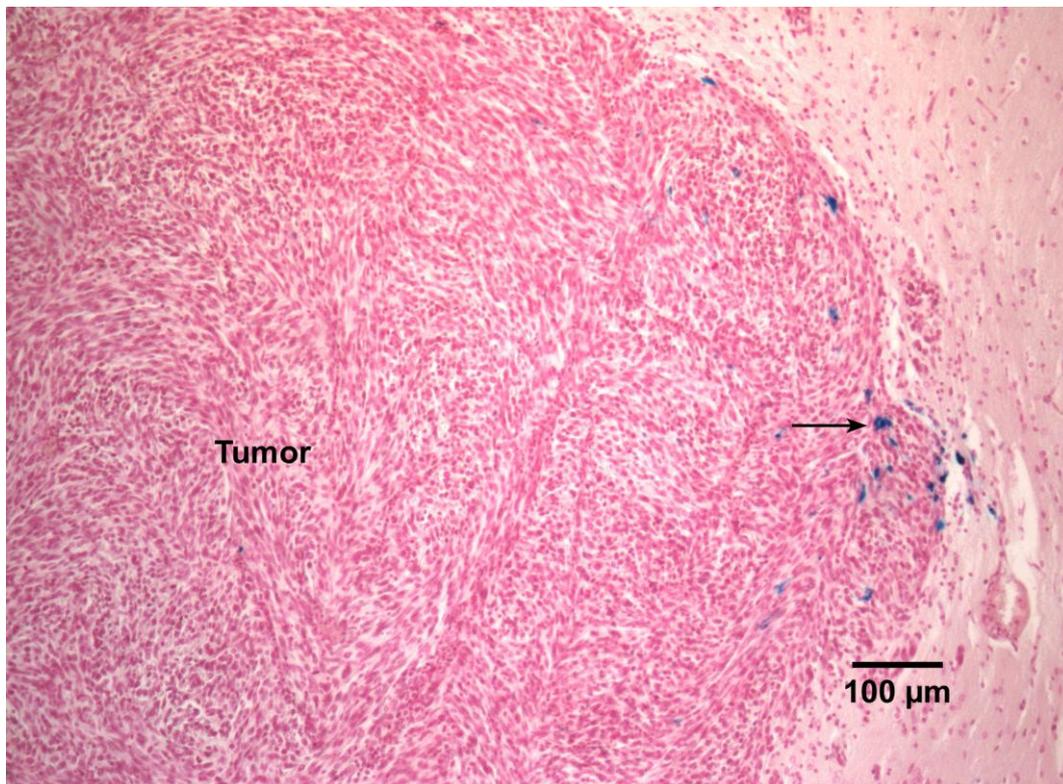


Abb.22: Eisenanreicherung am Tumorrand (Pfeil). VSOP-C i.z. (Score 1). Berliner-Blau-Färbung

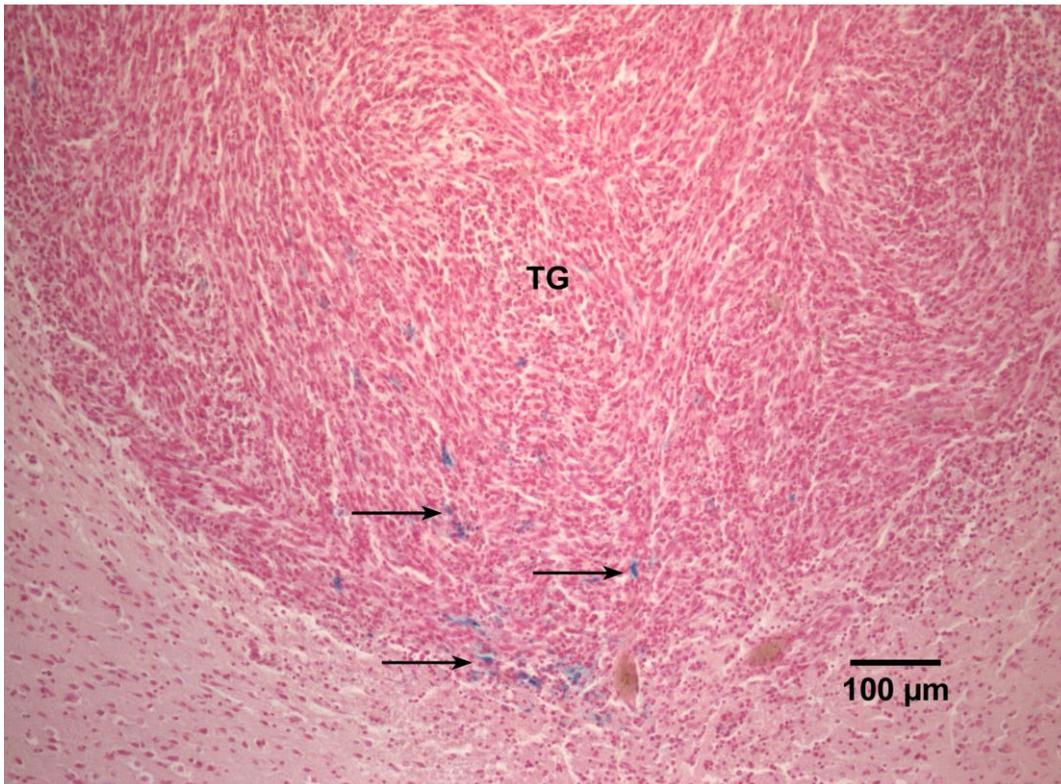


Abb.23: Eisenanreicherung am Tumorrand (Pfeile). Vereinzelt phagozytierte Partikel im Tumorgewebe (TG). VSOP-Protamin i.z. (Score 1). Berliner-Blau-Färbung

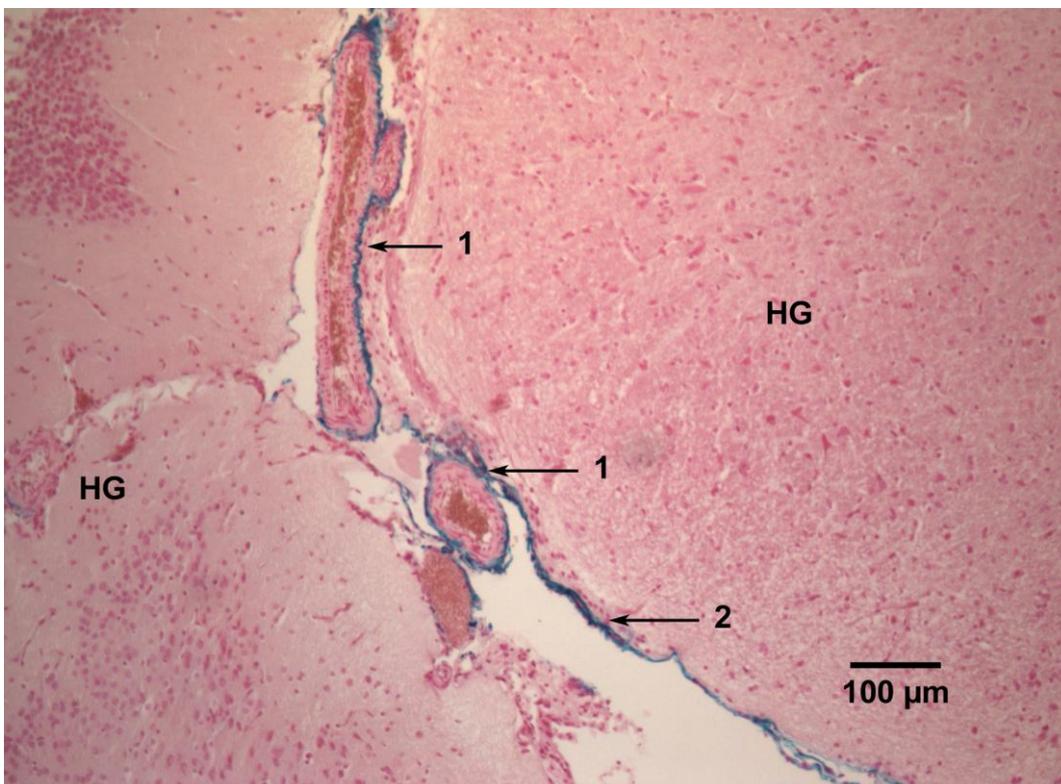


Abb.24: Periphere Eisenanreicherung perivaskulär (1) sowie an den Meningen (2) im gesunden Hirngewebe (HG). VSOP-DOXO i.z. Berliner-Blau-Färbung

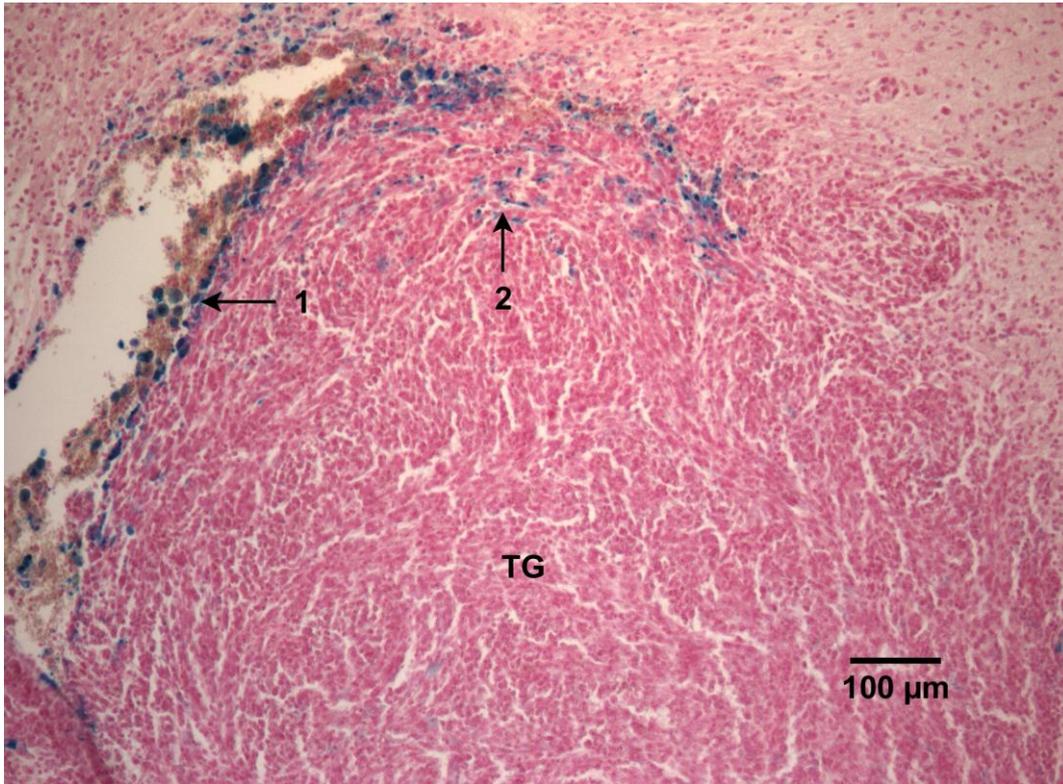


Abb.25: Einblutung am Tumorrand mit Eisenpartikeln im Gefäßlumen (1), sowie Eisenanreicherung bis in das Tumorgewebe = TG (2). Resovist S i.z. Berliner-Blau-Färbung

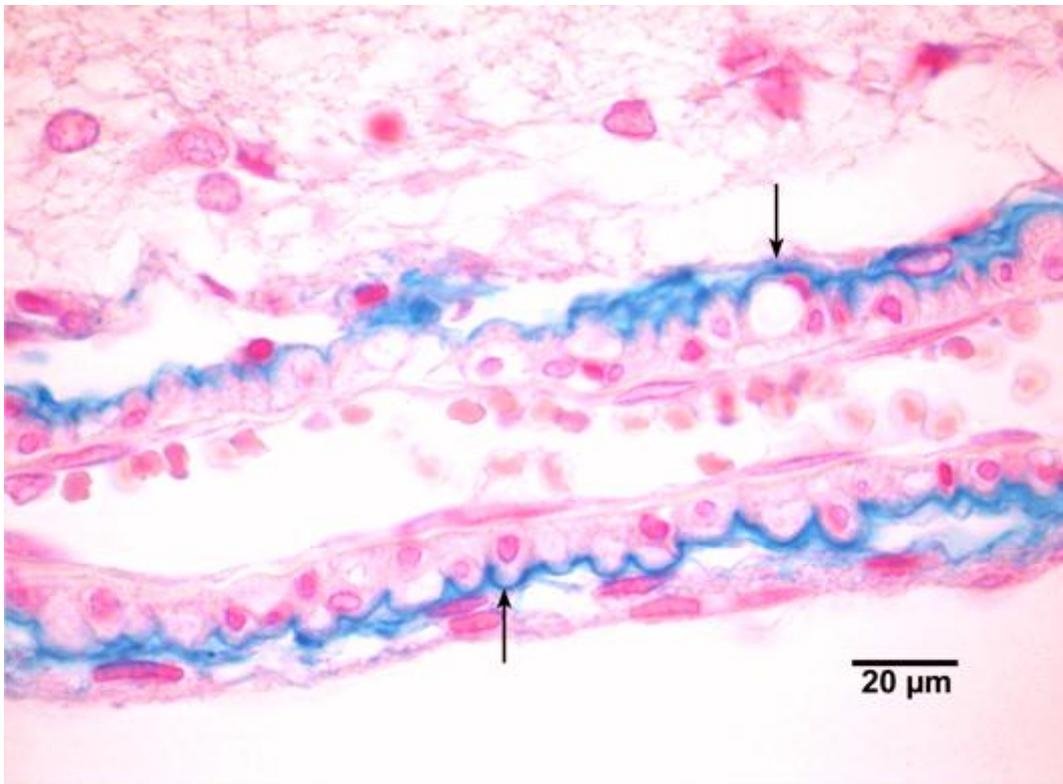


Abb.26: Fadenförmige Ablagerung des angefärbten Eisens perivaskulär. VSOP-C i.a. Berliner-Blau-Färbung

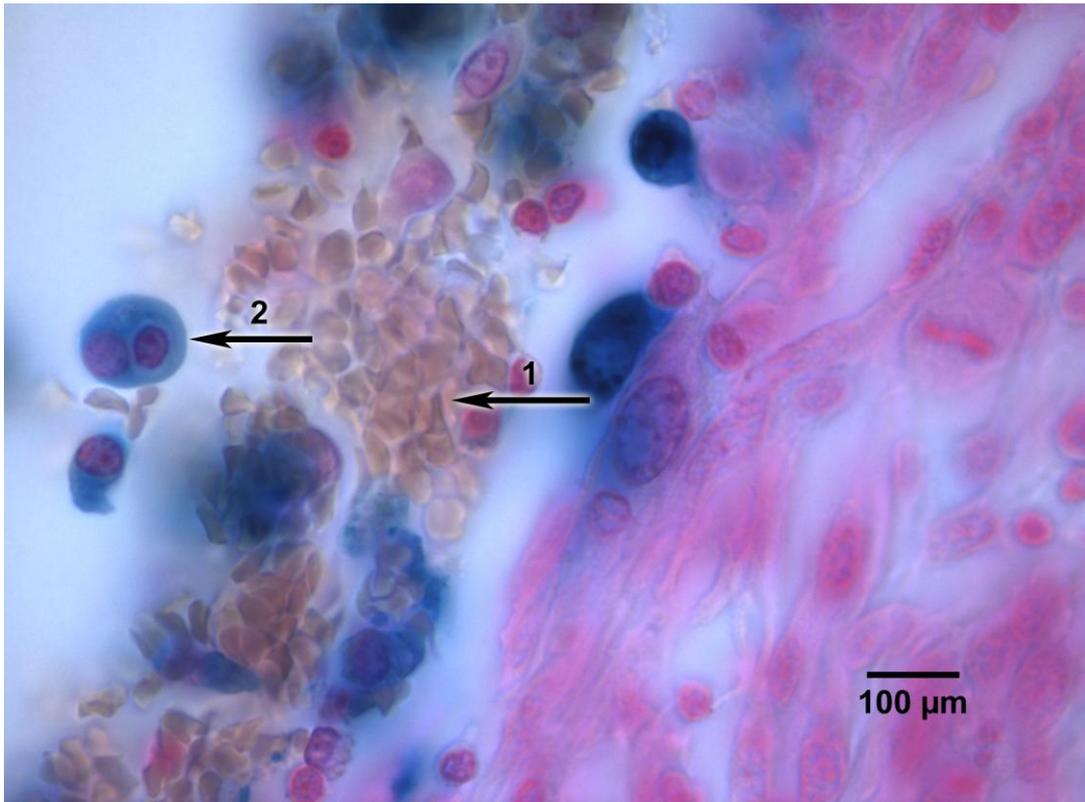


Abb.27: Nach der intrazisternalen Injektion von VSOP-Protamin. 1: Erythrozyten intravas- kulär.2: Phagozytiertes Eisen im Zytoplasma einer Zelle.

Die Quantifizierung der Eisenlokalisierung ist in den Tabellen 5-7 erfasst.

VSOP-C i.a.

Tiernummer	Tumorzentrum	Tumorrand	Peripherie
19	0	2	0
30	0	0	1
38	0	1	0
46	0	2	0
47	0	1	1

VSOP-C i.z.

Tiernummer	Tumorzentrum	Tumorrand	Peripherie
29	0	1	0
32	0	0	2
33	0	1	0
40	0	0	1
48	0	1	0

Tabelle 5: Eisenlokalisierung der Gruppen 1 (VSOP-C i.a.) und 2 (VSOP-C i.z.).

**VSOP-DOXO
i.a.**

Tiernummer	Tumorzentrum	Tumorrand	Peripherie
31	0	1	0
34	0	1	0
36	0	1	0
44	0	0	1
50	0	0	0

**VSOP-DOXO
i.z.**

Tiernummer	Tumorzentrum	Tumorrand	Peripherie
22	0	0	1
25	0	0	1
35	0	1	0
41	0	0	1
42	0	1	0

Tabelle 6: Eisenlokalisierung der Gruppen 3 (VSOP-DOXO i.a.) und 4 (VSOP-DOXO i.z.).

Resovist S i.z.

Tiernummer	Tumorzentrum	Tumorrand	Peripherie
24	0	1	1
27	0	1	0
28	0	1	0
43	0	0	1
45	0	0	1

**VSOP-Protamin
i.z.**

Tiernummer	Tumorzentrum	Tumorrand	Peripherie
51	0	1	0
52	0	1	0
54	1	0	1
55	0	0	1
56	0	0	1

Tabelle 7: Eisenlokalisierung der Gruppen 5 (Resovist S i.z.) und 6 (VSOP-Protamin i.z.).

6 Diskussion

Den größten Anteil bei den beim Menschen primär neu auftretenden Hirntumoren im ZNS bildet die Gruppe der Gliome mit ungefähr 40% (Poeck und Hacke 2001). Zusammen mit allen Neoplasien des Gehirns stellt das Glioblastom nach dem Schlaganfall die zweithäufigste, durch intrakranielle Erkrankung bedingte Todesursache dar. Die Therapie besteht im Wesentlichen aus einem massiven palliativen Vorgehen mit einer chirurgischen Tumorresektion und anschließender Strahlen- und/oder Chemotherapie. Mit einem chirurgischen Eingriff kann lediglich eine Reduktion der Tumormasse erreicht werden, das infiltrative Wachstum macht eine komplette Resektion unmöglich (Bello et al. 2002). Die Prognose ist in der Regel sehr schlecht und hat sich in den letzten 30 Jahren trotz der Fortschritte in Diagnostik und Therapie nicht verändert (Deorah et al. 2006). Aus diesem Grund befassen sich aktuelle Studien mit dem Einsatz neuer therapeutischer Strategien, wie der Entwicklung lokaler Applikationsmöglichkeiten.

Ein Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob sich mit ladungsstabilisierten superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln eine deutliche Anreicherung in einem zuvor etablierten Glioblastom-Modell erreichen lässt. Aus nicht veröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe Tautpitz war bekannt, dass unterschiedliche Ladungen zu unterschiedlichen Tumoranreicherungen führen. Als Applikationswege wurden die intraarterielle und die intrazisternale Applikation gewählt. Die Anreicherung der Eisenoxide sollte mittels MRT und Histologie dargestellt werden

6.1 Tumormodell

In der vorliegenden Arbeit wurde ein reproduzierbares Glioblastommodell der Ratte angewendet, bei dem ein experimenteller Gehirntumor in der rechten Großhirnhemisphäre erzeugt wurde. Dazu wurden die Verfahren der Zellkultur und die Inokulation der Zellen etabliert. Die Kultivierung der verwendeten Zelllinie GS-9L erfolgte gemäß den Angaben der vorliegenden Literatur (Lesniak et al. 2005). Für die Inokulation der Zellen wurden 1×10^6 Zellen in 10 μ l PBS verwendet (Petri et al. 2006). Aus den implantierten neoplastischen Tumorzellen entstand bei allen 30 Tieren ein schnell wachsender Tumor, welcher nach neun Tagen im MRT darstellbar war. Die stereotaktische Implantation von Tumorzellen stellt ein weit verbreitetes Verfahren dar und bietet bei technischer korrekter Ausführung viele Vorteile gegenüber einer Technik ohne die Verwendung eines stereotaktischen Rahmens. Durch eine langsame Verimpfung kann ein hoher Druck auf das Gehirn verhindert werden, und auch das Inokulationstrauma bleibt gering. Es ist jedoch nicht immer ersichtlich, wie weit sich die Zellen von

der primären Läsionsstelle entfernen und anwachsen. Diese Problematik zeigte sich bei zwei Ratten, hier kam es neben dem erwarteten Tumor zum extrazerebralen Anwachsen von Tumorzellen außerhalb der Schädeldecke.

6.2 Morphologische MRT

Für die Darstellung der experimentell erzeugten Tumoren kam ein klinischer 1,5 Tesla Ganzkörpertomograph zum Einsatz. Die MR-Aufnahmen dokumentieren eine gute Abgrenzbarkeit des malignen Tumors vom umgebenden Gewebe. Die Parameter für die einzelnen Sequenzen mussten zunächst festgelegt werden. In der T2-gewichteten Sequenz konnte der Tumor als hyperintense Struktur in der rechten Großhirnhemisphäre bei allen 30 Tieren mit qualitativ sehr klaren Bildern dargestellt werden. In den T1-gewichteten Sequenzen war das Tumoreal isointens zum umliegenden Gewebe. Unterschiedliche Studien konnten gute Ergebnisse mit einer hohen Detailerkennbarkeit und einer guten SNR mit einem klinischen 1,5 Tesla Ganzkörpertomographen und einer kommerziellen Spule erzeugen (Thorsen et al 2003; Ulmer et al. 2008).

6.3 MRT- Messungen nach Applikation der superparamagnetischen Eisenoxide

Superparamagnetische Eisenoxide haben aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften bereits in geringen Dosierungen Einfluss auf die Signalintensität und somit auf die Kontrastierung. Sie sind wegen ihrer Bioverfügbarkeit gut verträglich, verstoffwechselbar und zudem histologisch nachweisbar. Die Anreicherung von Magnetiten im Gewebe führt zu einer Signalreduktion, sichtbar als Schwärzung im MR-Bild (Wagner et al. 2002).

Das Anreicherungsverhalten der Eisenoxide nach intraarterieller Applikation wurde in einer Dosierung von 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$ zu 5 Zeitpunkten im MRT untersucht. Bei der Untersuchung mit VSOP-C ist bei 3 von 5 Tieren ein maximaler Abfall der signal-to-noise-ratio eine Minute nach der Applikation von ca. 50% zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Messungen ist kein deutlicher Unterschied in den Signaländerungen bei den Tieren dieser Gruppe festzustellen. Die Signalminderung, welche auf den MRT-Aufnahmen in den T1- und T2-gewichteten Bildern zu sehen ist, wird durch die Anreicherung der Eisenoxide im Liquorraum und im Gefäßsystem verursacht. Die Konzentrationen waren zum Teil so hoch, dass es zu einer vollständigen Signalauslöschung im T1-gewichteten Bild kam. Untersuchungen aus der Arbeitsgrup-

pe haben gezeigt, dass diese Partikel gut als Blut-pool-Kontrastmittel für die MR-Angiographie zur Darstellung der Koronararterien geeignet sind (Taupitz et al. 2003). Zu diesem Zeitpunkt gibt es noch keine Untersuchungen bezüglich ihrer Anreicherung in Gehirntumoren. Die Untersuchung in der vorliegenden Studie kam zu keinem befriedigenden Ergebnis bezüglich ihrer Anreicherung in dem hier verwendeten experimentellen Glioblastommodell. Das zweite VSOP, welches intraarteriell verabreicht wurde, war das VSOP-DOXO. Durch die Konjugation der Eisenoxide mit dem Zytostatikum Doxorubicin wurde der Gesamtdurchmesser der Partikel nicht verändert (ca. 7 nm) und die Ladung neutraler. Mit der Änderung der Partikeloberfläche wurde eine Verbesserung im Anreicherungsverhalten erwartet. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. Auch mit den Eisenoxiden kam es zu einer Signalintensitätsabnahme im Bereich der liquorführenden Strukturen sowie des Gefäßsystems bis zu einer Signalauslöschung. Die Auswertungen zeigten einen maximalen Abfall des Signals bei zwei Tieren von lediglich 22%-26% eine Stunde nach der Injektion. Bei beiden Gruppen steigt die Signalintensität zum Ende der Messzeit wieder an. Nach der Injektion der Eisenoxide kommt es bei den Tieren zwar zu einer messbaren Signalreduktion im Tumor, allerdings zu keinem einheitlichen Zeitpunkt. Die Tatsache, dass der SNR-Wert wieder ansteigt, spricht für einen Abtransport der Partikel aus dem Tumor. In verschiedenen Arbeiten wurde die Fähigkeit von oberflächenmodifizierten Nanopartikeln Arzneistoffe über die BHS zu transportieren, untersucht. Doxorubicin beladene Polysorbat-Nanopartikel (PL-NP) führten bei Ratten mit einem 101/8 Glioblastom bei bis zu 40% der Tiere zu einer kompletten Remission (Gulyaev et al. 1999; Steiniger et al. 2004). Dieses Partikelsystem hat einen Gesamtdurchmesser von ca. 270 nm. Als Mechanismus wird der LDL (low-density-lipoprotein) Rezeptor vermittelter Transport der Partikel an den Endothelzellen angenommen. Durch eine selektive Adsorption von Plasmaproteinen wird ein LDL-Partikel vorgetäuscht und mittels Transzytose aufgenommen (Steiniger et al. 2004). Weiterführende Untersuchungen sind nötig um über den Transportweg der VSOP an Endothelien eine Aussage machen zu können.

Als zweiter Applikationsweg wurde die intrazisternale Injektion gewählt. Die intrazisternale Verabreichung von Chemotherapeutika stellt eine besondere Form der Therapie dar. In der klinischen Anwendung wird das Zytostatikum über ein vorher implantiertes Reservoir das unter der Haut zu liegen kommt, direkt in den Liquorraum appliziert (Posner 1973; Patchell et al. 2002; Boirdi et al. 2008). Ein großer Vorteil der intrathekalen Gabe ist, dass einerseits tumornah ein höherer Wirkspiegel entsteht und andererseits die systemischen Nebenwirkungen geringer sind (Weller 2008; Pattel et al. 2009). Diese Tatsachen führten zu der Überlegung, die Eisenoxide direkt in den Liquorraum zu applizieren. Verglichen wurden vier verschiedene Partikelsysteme. Das VSOP-C (25 µmol Fe/kg) und das VSOP-DOXO (20 µmol Fe

/kg) zeigten ein sehr inhomogenes Bild bei der Betrachtung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Von fünf Tieren, die das VSOP-C erhielten, konnte nur bei einem Tier eine Signalmindering von knapp über 50% gemessen werden, eine Stunde nachdem die Partikel injiziert wurden. In der Gruppe 4 waren es 3 Tiere mit einem maximalen Signalintensitätsabfall von knapp unter 50% zwei Stunden nach Injektion der Eisenoxide (VSOP-DOXO). Auch bei den Gruppen 2 und 4 stieg das Signal wieder an. Die mit den vorangegangenen VSOPs erzielten, ernüchternden Ergebnisse führten zu der Überlegung, weitere Partikel zu untersuchen.

Mit Resovist S kamen mit Carboxydextran beschichtete Partikel mit einer Dosis von 25 $\mu\text{mol Fe/kg}$ zum Einsatz, die einen Gesamtdurchmesser von ca. 20 nm und eine positivere Oberflächenladung aufwiesen. Sie sind die kleinsten mit Polymer, beschichteten Partikel und gehören in die Gruppe der Superparamagnetischen Eisenoxide (SPIO). Diese Partikelart wird i.d.R. als Kontrastmittel für die MRT von Leber und Milz eingesetzt, basierend auf der Eigenschaft von Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) unspezifisch Partikel aus dem Blut aufzunehmen. Pathologische Gewebe wie hypovaskuläre Lebermetastasen, die keine MPS-Zellen enthalten, werden in ihrem Signal nicht oder nur geringfügig beeinflusst (Hamm et al. 1994). Andere Studien (Moore et al. 1997, Dousset et al. 1999, Fleige et al. 2001) untersuchten die Eigenschaft der ortständigen, aktivierten Makrophagen (Mikrogliazellen) in experimentellen Gehirntumoren, Eisenoxide zu phagozytieren. Die Tatsache, dass Gliomzellen Phagozytosekapazitäten besitzen, ist seit langer Zeit bekannt. Die Phagozytosekapazität der neoplastischen Glia ist gegenüber der astrozytären Glia wesentlich höher (Bjerknes et al. 1987). Die Infiltration von Gliomen mit lymphatischen Zellen und Makrophagen zeigt ein unspezifisches Muster innerhalb des Tumors sowie die Bildung eines gürtelförmigen Saums an der Peripherie (Roggendorf et al. 1996). Eine Studie von Zimmer et al. (1995) untersuchte u.a. die Aufnahme von monokristallinen Dextraneisenoxidverbindungen (MION) an 9L-Glioblastom tragenden Ratten. Die Tiere wurden 24 Stunden nach intravenöser Injektion von 10 mg Fe/kg in einem 1,5 T Magnetresonanztomographen untersucht. Der Eisennachweis erfolgte anschließend histologisch (DAB-verstärkte Perls-Färbung). Die Bildgebung zeigte ein ringförmiges Erscheinungsbild der Eisenoxide in den T1- und T2-gewichteten Sequenzen. Auch der histologische Nachweis des Eisens fiel positiv aus, im Zytoplasma der Tumorzellen und der Makrophagen färbten sich die aufgenommenen Partikel an. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass sich die applizierte Dosis deutlich von der hier verwendeten unterschied (ca. 180 $\mu\text{mol Fe/kg}$ vs. 25 $\mu\text{mol Fe/kg}$). Außerdem unterscheidet sich der intravenöse Applikationsweg erheblich von einer Injektion in die Cisterna magna. Ebenso wurden andere Färbemethoden zur Eisenlokalisation angewandt. Festzuhalten bleibt aber der positive Nachweis des Eisens im Tumor der Tiere. Hinreichend bekannt ist die Tat-

sache, dass die Störung der Blut-Hirn-Schranke bei malignen Gliomen sehr heterogen ist. Medikamente können so nicht alle Tumorareale erreichen. Chemoresistente Zellpopulationen erschweren die Therapie zusätzlich (Tanaka et al. 2001). Mit Hilfe von kationischen Nanopartikeln gelang es verschiedenen Autoren, die Blut-Hirn-Schranke in vitro und in vivo zu überwinden und eine gute Anreicherung im Gehirn bzw. im experimentellen Tumor zu erzielen. Lu et al. (2005) verglichen positive und ungeladene Nanopartikel bezüglich ihrer Permeabilität an der Blut-Hirn-Schranke in vitro. Konjugation mit geladenem (cationic bovine serum albumin = CBSA) oder neutralem bovines Serumalbumin führte zu den unterschiedlichen Partikeln. Die kationischen Partikel (CBSA-NP) erzielten eine 7-fach gesteigerte Transzytoserate gegenüber den ungeladenen Partikeln. Resultierend aus diesen Ergebnissen wurden die CBSA-Nanopartikel in einer späteren Studie (Lu et al. 2007) mit dem Antrazyklin Aclarubicin beladen und C6-Glioblastom tragenden Ratten intravenös injiziert. Die mittels eines Fluoreszenzmarkers ermittelte Akkumulation eine Stunde post injektionem war um den Faktor 3 höher als bei unbeladenen Partikeln, die Retention nach 24 Stunden sogar 6-fach erhöht. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Leber-, Nieren- und Herz-Toxizität von Aclarubicin durch die Konjugation an CBSA-NP reduziert werden kann. Abschließend kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass diese Art der Partikel eine therapeutische Option bei einem Glioblastom darstellen könnte (Lu et al. 2007). Noch eine weitere Tatsache führte zu der Überlegung, Resovist S[®] bezüglich der Anreicherung im Glioblastom zu untersuchen. Eine Weiterentwicklung in der Antiangiogenese Therapie von Krebspatienten ist die gezielte Zerstörung der Gefäßneubildung eines Tumors oder dessen Metastasen. Diese Wirkung wird erzielt durch die Kombination von lipid-basierten Komplexen, die eine sehr hohe Affinität zur Oberfläche von Tumorendothelien zeigen, mit einem hochpotenten zytostatischen Wirkstoff aus der Gruppe der Taxane. Während der Angiogenese kommt es zur verstärkten Bildung von negativ geladenen, aktivierten Endothelzellen sowie zu einer Überexpression von negativ geladenen Proteinen wie den Proteoglykanen Perlekan, Glypican-1 und Syndekan. Des Weiteren wird auch das negativ geladene Lipid Phosphatidylserin an der luminalen Seite der Endothelzellen überexprimiert. All diese Proteine stellen potenzielle Bindungsstellen für kationische lipid-basierte Komplexe dar. Kunstfeld und Kollegen veröffentlichten eine Untersuchung zu einer solchen Formulierung (MBT-0206) (Kunstfeld et al. 2003). In verschiedenen präklinischen Studien mit MBT-0206 konnte seine therapeutische Wirksamkeit wie Tumoregression, Verringerung der Metastasenbildung sowie erhöhte Überlebensrate eindrucksvoll gezeigt werden. Da in erster Linie nicht Tumorzellen selbst, sondern genetisch stabile Endothelzellen angegriffen werden, wurde auch nach wiederholter Applikation bisher keine Resistenzbildung beobachtet. Die Zerstörung der Gefäßneubildung richtet sich nicht nach der Tumorart und den zugrunde liegenden angiogenetischen Faktoren. Somit ergibt sich ein klarer Vorteil gegenüber der Antiangiogenese Therapie. Dies könnte die Möglichkeit

eröffnen, Chemotherapie-resistente Patienten zu behandeln. Seit Mitte 2002 wurde MBT-0206 in klinischen Studien der Phase I an Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung erprobt. Seit Anfang 2003 befindet sich MBT-0206 in der klinischen Phase Ib/IIa (Brunner et al. 2004). Eine in vitro Studie (Jallouli et al. 2007) belegte ebenfalls eine erhöhte Transzytoserate an der BHS von neutral bzw. positiv geladenen Nanopartikeln gegenüber Partikeln mit negativer Ladung. Trotz des deutlich größeren Partikeldurchmessers und der positiveren Ladung von Resovist S, im Vergleich zu den Citrat-Partikeln, erfolgte in der vorliegenden Arbeit nur eine marginale Anreicherung im Tumor. Es kam nicht zu einer signifikanten Änderung im Signalverhalten (siehe Abb. 14). Nur bei einem Tier dieser Gruppe war ein relativ deutlicher maximaler Signalabfall von 40% eine Stunde nach Applikation von Resovist S zu sehen. Anders als die oben erwähnten kationischen Partikel (CBSA-NP) scheint Resovist S keine Affinität zu negativ geladenen Tumorendothelien zu haben.

Mit dem VSOP-Protamin wurden nun positiv geladene Nanopartikel verwendet. Sie besaßen einen Gesamtpartikeldurchmesser von ca. 15 nm. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es lediglich eine Arbeit, die sich mit einer Protamin-Verbindung beschäftigt hat. In einer in vitro Studie wurden Protamin-Oligonukleotide mit dem Apolipoprotein A-I beladen und ihre Transzytose an einem porcinen Blut-Hirn-Schranken-Modell untersucht. Verglichen mit nicht beladenen Partikeln konnte mit diesen Partikeln eine höhere Aufnahme durch Astrozyten erzielt werden (Kratzer et al. 2007). Das Partikelsystem, das in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, war zwar deutlich kleiner als alle bisher beschriebenen, zeigte letztendlich in der Anreicherung im experimentellen Gehirntumor allerdings kein zufriedenstellendes Ergebnis. Eine denkbare Erklärung kann die fehlende Lipophilie aller verwendeten Partikel sein, deren Bedeutung eventuell doch maßgeblicher zu sein scheint als die Größe allein.

Bei der magnetresonanztomographischen Betrachtung und Bewertung der vier verschiedenen Eisenoxidnanopartikel fielen die Unterschiede insgesamt sehr gering aus und konnten statistisch nicht gesichert werden. Betrachtet man den Verlauf des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, so unterscheiden sich die Werte zu den einzelnen Messzeitpunkten nur sehr gering, was schon ein erster Hinweis auf die tatsächlich aufgenommene Eisenmenge ist. Weiterhin kann keine Aussage darüber getroffen werden, über welchen Applikationsweg eine höhere Anreicherung im Tumor erzielt werden kann. Über das Anreicherungsverhalten von sehr kleinen superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (VSOP) im ZNS nach einer suboccipitalen Injektion in den Subarachnoidalraum gibt es bisher keine Untersuchungen. Eine Studie aus den 1980iger Jahren (Allard et al. 1987) verglich die Verteilung und Anreicherung verschiedener Gadoliniumkomplexe im Gehirn von Ratten. Die Tiere erhielten jeweils 2 µl eines Gadolinium-Komplexes (0,5 M) intrazisternal. Die Verbindungen unterschieden sich

hinsichtlich ihrer Stabilität. Lediglich 0,1% der stabilsten Lösung wurde 24 Stunden post injectionem noch gefunden, hingegen waren noch 11% der Verbindung mit der höchsten Hydrophilie (EDTA-Gd-Mg) nach 11 Tagen nachzuweisen. Die Autoren machen keine Angaben über die Größe und die Ladung der von ihnen eingesetzten Substanzen (Allard et al. 1987).

6.4 Histologische Auswertung der Präparate

Die Charakterisierung des Tumorgewebes wurde an mittels Hämatoxylin-Eosin gefärbten Tumorpräparaten durchgeführt. Die Tumorzellen zeigten Atypie und Polymorphie, beides typische Malignitätscharakteristika. Als weitere Charakteristika traten vaskuläre Proliferationen sowie kleine nekrotische Areale im Tumorgewebe auf. Das für das Glioblastom kennzeichnende infiltrative Wachstum wurde anhand verstreuter Tumorzellen in die Tumorumgebung und einer nicht durchgängigen Tumorkapsel sichtbar.

Die Darstellung der tatsächlichen Eisenanreicherung im Gehirntumor wurde mit Hilfe einer Berliner-Blau-Reaktion vorgenommen. Da im Bereich des Großhirns kein körpereigenes Eisen zu erwarten ist, muss es sich bei dem nachgewiesenen Eisen um Rückstände der injizierten Partikel handeln. Hierbei wird phagozytisiertes, dreiwertiges Eisen angefärbt, das übrige Eisen wird beim Fixierungs- und Färbeprozess herausgewaschen. Die Gehirne der Tiere wurden ca. 24 Stunden nach Injektion der superparamagnetischen Eisenoxide entnommen und nach Fixierung und Aufarbeitung angefärbt. Das Verteilungsmuster des Eisens variierte leicht von Tier zu Tier, auch innerhalb einer Gruppe. Es konnte kein Zusammenhang zwischen vorhandenen Gefäßstrukturen und dem angefärbten Eisen gefunden werden. Um eine gesicherte Aussage darüber treffen zu können, wären allerdings weitere Färbungen nötig gewesen. Auffällig waren teilweise erhebliche Ablagerungen des Eisens im Bereich der Hirnventrikel, entlang der Fissura longitudinalis oder tumorfern. Im Tumor selbst stellt die Anreicherung im Randbereich den Hauptteil dar. Die Anreicherungsunterschiede der einzelnen Eisenoxide in den 6 Gruppen konnten statistisch nicht gesichert werden. Aufgrund weniger Vorarbeiten, die sich mit dem histologischen Nachweis superparamagnetischer Eisenoxide beschäftigen, ist die Frage nach dem Stellenwert dieser Auswertung gerechtfertigt. Wilkins et al. (1995) fanden sehr gute Übereinstimmungen von Gd-kontrastierter MRT und histologischen Untersuchungen bei Gehirntumoren der Ratte. Auch in bereits an anderer Stelle erwähnten Arbeiten konnten USPIOs anhand histologischer Färbungen sicher nachgewiesen werden (Douset et al. 1999; Moore et al. 2000; Fleige et al. 2001, Muldoon et al. 2005). In den genannten Arbeiten kamen jeweils dextransummantelte Partikel zum Einsatz. VSOPs konnten durch Heymer und Mitarbeiter (2008) mittels Berliner-Blau Färbung in mesenchyma-

len Stammzellen nachgewiesen werden. Auch unveröffentlichte Studien aus der eigenen Arbeitsgruppe belegen die Nachweisbarkeit des Eisens der VSOPs in unterschiedlichen Geweben. Im Gegensatz zu den oben aufgezählten Arbeiten wurden in der vorliegenden Arbeit keine weiteren Zellfärbungen angefertigt, die eine Aussage darüber erlauben, welche Zellart die Eisenoxide aufgenommen hat. Da schon die ersten Versuche eine nur sehr geringe Anreicherung zeigten, wurde vorerst der Frage nachgegangen, mit welcher Modifizierung der Eisenoxide bessere Ergebnisse zu erzielen sein könnten.

Eine Vergleichbarkeit zwischen den in der MRT erzeugten Schnittbildern und den histologischen Präparaten ist nur in Bezug auf die Lokalisation des erzeugten Tumors möglich. Es muss berücksichtigt werden, dass die Schichtdicke im MRT 1 mm aufweist, die histologischen Präparate aber mit 10 μm weitaus feiner sind. Die im MR sichtbaren Signalintensitätsänderungen werden durch alle sich in diesem Bereich befindenden Eisenoxide erzeugt. Im histologischen Bild sichtbar bleiben die aufgenommenen Eisenpartikel, welche aus diagnostisch-therapeutischer Sicht auch entscheidend sind.

Das in dieser Arbeit verfolgte Ziel, ein Partikelsystem mit entsprechender Ladung zu finden, welches in der Lage ist, sich in dem experimentellen Tumor anzureichern, führte nicht zu dem erhofften Ergebnis. In dem hier verwendeten Tumormodell (GS-9L) konnte die Hypothese, dass superparamagnetische Eisenoxidpartikel mit positiven und negativen Ladungen ein unterschiedliches Anreicherungsverhalten aufweisen, nicht bestätigt werden.

7 Zusammenfassung

Magnetresonanztomographische Untersuchung verschiedener Eisenoxidnanopartikel bezüglich ihrer Anreicherung am Glioblastom-Modell der Ratte

Mit der Diagnosestellung eines Glioblastoms liegt die mittlere Überlebenszeit für den Patienten zwischen 12 und 15 Monaten. Die äußerst schwierige Behandlung beruht einerseits auf dem destruktiven und invasiven Wachstum des Tumors, andererseits auf der eingeschränkten Blut-Hirn-Schrankengängigkeit der Chemotherapeutika. Eine endgültige Heilung ist unmöglich. Eine Vielzahl von Studien beschäftigt sich seit Jahren mit einer Verbesserung der bisher aussichtslosen Therapieoptionen. So finden auch Superparamagnetische Eisenoxide bereits Anwendung in der Diagnostik und sind Gegenstand unterschiedlicher Forschungsschwerpunkte.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Glioblastom-Modell der Ratte zu etablieren und daran das Anreicherungsverhalten der hinsichtlich ihrer Ladung unterschiedlichen superparamagnetischen Eisenoxide zu untersuchen (VSOP-C, VSOP-DOXO, Resovist S, VSOP-Protamin). Als Applikationswege wurden die intraarterielle und die intrazisternale Injektion miteinander verglichen. Abschließend sollte eine Aussage darüber getroffen werden, welches Partikelsystem in der Lage ist, sich im Tumor anzureichern. In Zukunft könnten solche Partikel mit Chemotherapeutika beladen werden und so im Sinne einer lokalen Tumorthherapie zu einer hohen Anreicherung des Medikaments im Tumorgewebe führen.

Neun Tage nachdem den Tieren 9L-Glioblastomzellen mit Hilfe eines stereotaktischen Rahmens inokuliert wurden, erfolgte die Messung des Tumors im MRT. Nach der Nativmessung erfolgten drei Messungen im Abstand von einer Minute, einer Stunde und zwei Stunden nach Injektion der superparamagnetischen Eisenoxide. Am darauf folgenden Tag wurde der Versuch mit einer 24-Stunden-Messung beendet, anschließend wurden die Tiere in tiefer Narkose euthanasiert. Insgesamt 6 Gruppen wurden miteinander verglichen. Insgesamt 30 Ratten wurden à 5 Tiere in 6 Gruppen eingeteilt. Für die intraarterielle Applikation in die Arteria carotis communis erhielten alle Tiere der Gruppe 1 eine Dosis von 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$. Die Tiere der Gruppe 2 erhielten intrazisternal eine Dosis von 25 $\mu\text{mol Fe/kg}$. Die Tiere der Gruppe 4 erhielten eine Dosis von 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$, die Tiere der Gruppen 5 und 6 erhielten eine Dosis von 25 $\mu\text{mol Fe/kg}$ intrazisternal. Die Auswertung erfolgte anhand der Messung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (SNR = signal to noise ratio) im Tumor mit T1- und T2-gewichteten

Gradientenecho- und Spinecho-Sequenzen. Anschließend wurden die Tumoren entnommen und histologisch zur Charakterisierung des Gewebes mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE) und zur Prüfung des Eisengehaltes mittels Berliner-Blau-Färbung untersucht.

An dem hier verwendeten Tumormodell wurde erstmalig die Anreicherung der monomer stabilisierten superparamagnetischen Eisenoxide untersucht. In den vergleichenden MRT-Untersuchungen mit den superparamagnetischen Eisenoxiden konnten keine signifikanten Unterschiede im SNR gefunden werden. Die marginale Abnahme der Signalintensitäten in den Tumoren nach der Injektion der Eisenoxide ließ keine Aussage über den am besten geeigneten Injektionsweg zu.

In der histologischen Charakterisierung (HE) wurde das Gewebe als maligner Gehirntumor eingestuft mit typischen Merkmalen eines Glioblastoma multiforme. Mit der Eisenfärbung konnten Hinweise auf eine geringe Anreicherung des injizierten Eisens im Tumorrandbereich gefunden werden.

In dem hier verwendeten Tumormodell (GS-9L) konnte die Hypothese, dass Eisenoxidpartikel mit positiven und negativen Ladungen ein unterschiedliches Anreicherungsverhalten im Glioblastom der Ratte aufweisen, nicht bestätigt werden.

8 Summary

Magnetic Resonance Imaging Study of the Accumulation of Different Iron Oxide Nanoparticles in a Rat Glioblastoma Model

Patients diagnosed with glioblastoma have a mean survival of 12 to 15 months. Glioblastomas are extremely difficult to treat due to destructive and invasive growth and because chemotherapeutic agents do not easily cross the blood-brain barrier. Definitive cure is not possible. Superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles are used to improve diagnostic applications of magnetic resonance imaging (MRI) and various new applications are under investigation.

The aim of this study was to establish a glioblastoma model of the rat for investigating accumulation of different SPIO preparations that differ in size and loading (VSOP-C, VSOP-DOXO, Resovist S, VSOP protamine). Two routes of administration were compared: Intra-arterial and intracisternal injection. The ultimate aim of these investigations was to identify the particle preparation with optimal accumulation in glioblastomas using a simple routine of administration.

MRI with T1- and T2-weighted gradient echo and spin echo sequences was performed nine days after inoculation of rats with 9L glioblastoma cells using a stereotactic frame. The rats were divided into six groups which were imaged after intraarterial or intracisternal administration of different SPIO preparations. MR images were acquired one minute, one hour, and two hours after injection. Another MRI examination was performed after 24 hours before the animals were euthanized in deep anesthesia. MRI data sets were analyzed by determination of signal-to-noise ratios (SNR). Tumors were removed for histologic tissue characterization using hematoxylin and eosin (H&E) stain and determination of iron content using Berlin blue stain. The MRI results obtained with different SPIO particles did not reveal differences in SNR. There was only a minimal decrease in signal intensity after injection of the different SPIO preparations, and the data allowed no conclusions to be drawn regarding the most suitable route of administration.

Histologic workup (H&E) demonstrated malignant brain tumors with typical features of multi-form glioblastoma. Staining for iron identified minimal accumulation of the injected iron particles in the tumor margin.

The hypothesized differences in accumulation of positively and negatively charged iron oxide particles were not confirmed in the tumor model (GS-9L) investigated here.

9 Literaturverzeichnis

- Abraham, R., R. C. Basser, et al. (1996). "A risk-benefit assesment of anthracycline antibiotics in antineoplastic therapy". Drug Saf 6, 406-429.
- Ahlbom, A., M. Feychting, et al. (2007). "Cellular telephone use and cancer risk: update of a nationwide Danish cohort study". J Natl Cancer Inst 99(8): 655; author reply 655-6.
- Allard, M., P. Kien, et al. (1987). "Distribution of MRI contrast media in rats after intracisternal injection". J Neuroradiol 14, 383-387.
- Allkemper, T., C. Bremer, et al. (2002). "Contrast-enhanced blood-pool MR angiography with optimized iron oxides: effect of size and dose on vascular contrast enhancement in rabbits". Radiology. 223(2):432-8.
- Amarg Singh, S., M. R. Macleod, et al. (2009). "What is the translational efficacy of chemotherapeutic drug research in neuro-oncology? A systematic review and meta-analysis of the efficacy of BCNU and CCNU in animal models of glioma". J Neurooncol 91(2):117-25. Epub 2008 Sep 24.
- Anzai, Y., M. R. Prince, et al. (1997). "MR angiography with an ultrasmall superparamagnetic iron oxide blood pool agent". J Magn Reson Imaging 7(1): 209-14.
- Bagley, R. S., P. R. Gavin, et al. (1999). "Clinical signs associated with brain tumors in dogs: 97 cases (1992-1997)". J Am Vet Med Assoc 215(6): 818-9.
- Barry S. E. (2008). "Challenges in the development of magnetic particles for therapeutic applications". Int J Hyperthermia. 24(6): 451-66.
- Bart, J., H. J. Groen, et al. (2000). "The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation". Cancer Treat Rev 26(6):449-62.
- Bauer, B., A. M. Hartz, et al. (2004). "Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier". Mol Pharmacol 66(3):413-9.

- Beauchesne, P. D., R. M. Pedoux, et al. (2003). "Intracerebral C6 glioma model in female hairless rats: assesment by using MRI and follow-up of irradiation". Anticancer Res 23, nr. 5A, 3755-3760.
- Bello, L., C. Guissani, et al. (2002). "Suppression of malignant glioma recurrence in a newly developed animal model by endogenous inhibitors". Clin Cancer Res. 8(11):3539-48.
- Bendszus, M., R. Burger, et al. (2002). "A reproducible model of an epidural mass lesion in rodents. Part II: Characterization by in vivo magnetic resonance imaging". J Neurosurg 97(6): 1419-23.
- Berger, M. S. (1994). "Malignant astrocytomas: surgical aspects". Semin Oncol 21(2): 172-85.
- Bragg, D. G. and A. G. Osborn (1991). "CNS imaging of neoplasms". Int J Radiat Oncol Biol Phys 21(3): 841-5.
- Boiardi, A., A. Silvani, et al. (2008). "Treatment of recurrent glioblastoma: can local delivery of mitoxantrone improve survival?". J Neurooncol 88(1):105-13. Epub 2008 Feb 19.
- Bonnemain, B. (1998). "Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physico-chemical characteristics and clinical applications. A Review". J Drug Target 6: 167-74.
- Brem, S., R. Cotran, et al. (1972). "Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading". J. Natl. Cancer Inst 48: 347-356.
- Brillet, G., M. Dubois, et al. (1991). "Renal tolerance of AMI 25". Invest Radiol 26(10): 879-81.
- Brix, G., H. Kolem. (1997). Bildkontraste und Bildgebungssequenzen. In: Magnetresonanztomographie. M. Reiser und W. Semmler (Hrsg.) 2.Auflage. Springer. Berlin. 37-76.
- Bruce, J., R. C. Anderson, et al. "Glioblastoma multiforme"
<http://www.emedicine.com/Med/article/283252-overview>.
- Brunner, C., A. Werner, et al. (2004). "Cationic lipid complexed drugs for anti-neovaskular tumour therapy. Cancer Therapy

- Buckner, J. C. (2003). "Factors influencing survival in high-grade gliomas". Semin Oncol 30(6 Suppl 19): 10-4.
- Burger, P. C., E. R. Heinz, et al. (1988). "Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme". J Neurosurg 68(5): 698-704.
- Byrne, T. N. (1994). "Imaging of gliomas". Semin Oncol 21(2): 162-71.
- Campbell, R. B., B. Ying, et al. (2009). "Fighting cancer: from the bench to bedside using second generation cationic liposomal therapeutics". J Pharm Sci. 98(2):411-29.
- Carter, S. K. (2000). "Clinical Strategy for the development of angiogenesis inhibitors". The Oncologist 5, Suppl. 1:51-54.
- Clarke, S. E., H. J Weinmann, et al. (2000). "Comparison of two blood pool contrast agents for 0.5-T MR angiography: experimental study in rabbits". Radiology 214:787-794.
- Chen, W., S. Delaloye, et al. (2007). "Predicting treatment response of malignant gliomas to bevacizumab and irinotecan by imaging proliferation with [18F] fluorothymidine positron emission tomography: a pilot study". J Clin Oncol 25(30): 4714-21.
- Collins, V. P. (2004). "Brain tumours: classification and genes." J Neurol Neurosurg Psychiatry 75 Suppl 2: ii2-11.
- Culver, K. W., Z. Ram, et al. (1992). "In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors". Science. 12;256(5063): 1550-2.
- Dabbas, S., R. R. Kaushik, et al. (2008). "Importance of the liposomal cationic lipid content and type in tumor vascular targeting: physicochemical characterization and in vitro studies using human primary and transformed endothelial cells". Endothelium 15(4):189-201.
- Deorah, S., C. F., Lynch, et al. (2006). "Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001". Neurosurg Focus 15; 20(4): E1.

- Diener, H. Chr., et al. Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; 3. überarbeitete Auflage 2005. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Dinapoli, R. P., L. D. Brown, et al. (1993). "Phase III comparative evaluation of PCNU and carmustine combined with radiation therapy for high-grade glioma". J Clin Oncol 11(7): 1316-21.
- Di Piazza, M., C. Mader, et al. (2007). "Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells". J Virol. Apr;81(8): 4186-98. Epub.
- Dobson, J. M., Duncan, B. and Lascelles, Y. (2003). BRVA Manual of Canine and Feline Oncology Second Edition BRVA.
- Dousset, V., C. Delalande, et al., (1999). "In vivo macrophage activity imaging in the central nervous system detected by magnetic resonance". Magn Reson Med 41(2): 329-33.
- Druckrey, H., S. Ivankovic, et al. (1964). "Selective Induction of Carcinoma of the Paranasal Sinuses in Rats with N,N'-Di-Nitrosopiperazine, Nitrosopiperidine, Nitrosomorpholine, Methylallyl-, Dimethyl- and Methylvinyl Nitrosamine". Z Krebsforsch 66: 138-50.
- Eichhorn, M. E., S. Strieth, et al. (2004). "Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels". Angiogenesis 7(2):133-41.
- Fellner, S., B. Bauer, et al. (2002). "Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo". J Clin Invest 110(9):1309-18.
- Fleige, G., C. Nolte, et al. (2001). "Magnetic labeling of activated microglia in experimental gliomas". Neoplasia 3(6):489-99
- Fontana, M., C. Stanton, et al. (1987). "Late multifocal gliomas in adolescents previously treated for acute lymphoblastic leukemia". Cancer 60(7): 1510-8.
- Forterre, F., U. Schrell, et al. (2000). "Das intrakranielle Meningiom. Befunde, Therapie und Ergebnisse bei 9 Katzen und einem Hund". Tierärztl Prax. 28 (K), 170-177.

- Frankel, S. A. and W. J. German (1958). "Glioblastoma multiforme : review of 219 cases with regard to natural history, pathology, diagnostic methods, and treatment". J Neurosurg 15(5): 489-503.
- Friedmann, H. S., T. Kerby, et al. (2000). "Temozolomide and the treatment of malignant glioma". Clin Can Res 6: 2585-2597.
- Fricker, G. (2005). Pressemitteilung Universität Heidelberg. Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie
- Fulci, G., M. Labuhn, et al. (2000). "p53 gene mutation and ink4a-arf deletion appear to be two mutually exclusive events in human glioblastoma". Oncogene 19(33): 3816-22.
- Galanis, E. and J. Buckner (2000). "Chemotherapy for high-grade gliomas". Br J Cancer 82(8): 1371-80.
- Giese, A. and M. Westphal (2001). "Treatment of malignant glioma: a problem beyond the margins of resection". J Cancer Res Clin Oncol 127(4): 217-25.
- Glas, M., T. Hundsberger, et al. (2009). "Nimustine (ACNU) plus teniposide (VM26) in recurrent glioblastoma". Oncology 76(3):184-9. Epub 2009 Feb 13.
- Goerne, R., U. Bogdahn, et al. (2008). "Procarbazine--a traditional drug in the treatment of malignant gliomas". Curr Med Chem 15(14):1376-87.
- Goetz, C. G .and J. E. Rappert. (2003). Textbook of Clinical Neurology. 933-955. W. B., Saunders Company.
- Goldbrunner, R. H., M. Bendszus, et al. (2000 a). "Vascular endothelial growth factor-driven glioma growth and vascularization in an orthotopic rat model monitored by magnetic resonance imaging". Neurosurgery 47(4): 921-9; discussion 929-30.
- Goldbrunner, R. H., S. Wagner, et al. (2000 b). "Models for assessment of angiogenesis in gliomas". J Neurooncol 50(1-2): 53-62.

- Gorlia, T., M. J. Van den Bent, et al., (2008). "Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3" Jancet Oncol 9(1):29-38. Epub 2007 Dec 21.
- Green, S. B., D. P. Byar, et al. (1983). "Comparisons of carmustine, procarbazine, and high-dose methylprednisolone as additions to surgery and radiotherapy for the treatment of malignant glioma". Cancer Treat Rep 67(2): 121-32.
- Grodd, W und K. Voigt. (1997). Intrakranielle Tumoren. In: Magnetresonanztomographie. M. Reiser und W. Semmler (Hrsg.) 2.Auflage. Springer. Berlin. 129-184.
- Gulyaev, A. E., S. E. Gelperina, et al. (1999). "Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles". Pharm Res 16(10):1564-9.
- Hamm, B., T. Staks, et al. (1994). "Contrast-enhanced MR imaging of liver and spleen: first experience in humans with a new superparamagnetic iron oxide". J Magn Reson Imaging 4(5): 659-68.
- Hegi, M. E., A. C. Diserens, et al. (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma". N Engl J Med 352(10): 997-1003.
- Henke, D. (1993). Doxorubicinhydrochlorid, in Kommentar zum DAB. p. 1-6.
- Herrero, Y. C. M., J. J. Cornelis, et al. (2004). "Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing". Int J Cancer 109(1): 76-84.
- Hess, C. F., J. C. Schaaf, et al. (1994). "Malignant glioma: patterns of failure following individually tailored limited volume irradiation." Radiother Oncol 30(2): 146-9.
- Heymer, A., D. Haddad, et al. (2008). "Iron oxide labelling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair". Biomaterials 29(10) 1473-83
- Hochberg, F. H. and A. Pruitt (1980). "Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma". Neurology 30(9): 907-11.

- Hofer, S. u. M., A. (2002). "Therapeutische Optionen für maligne Gliome WHO-Grad III und IV". Schweiz Med Forum Nr. 32/23.
- Hoshino, T. (1984). "A commentary on the biology and growth kinetics of low-grade and high-grade gliomas". J Neurosurg 61(5): 895-900.
- Hutterer, M., E. Gunsilius, et al. (2006): "Molecular therapies for malignant glioma". Wien Med Wochenschr 156(11-12):351-63.
- Iefebure, S., E., Dubois, et al. (1998). "Monodisperse magnetic nanoparticles: preparation and dispersion in water and oils". J Matter Res 13: 2975-2981.
- Iwadate, Y., M. Inoue, et al. (2005). "Recombinant Sendai virus vector induces complete remission of established brain tumors through efficient interleukin-2 gene transfer in vaccinated rats". Clin Cancer Res 11, Nr. 10, 3821-3827.
- Jallouli, Y., A. Paillard, et al. (2007). "Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood-brain barrier in vitro". Int J Pharm 1; 344(1-2):103-9. Epub 2007 Jun 22.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008". CA Cancer J Clin 58(2): 71-96.
- Jordan, A., P. Wust, et al. (1996). "Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro". Int J Hyperthermia 12(6): 705-22.
- Jordan, A., K. Maier-Hauff, et al. (2007). "Magnetic nanoparticles for intracranial thermotherapy". J Nanotechnol 7(12):4604-6
- Kahn-Farooqi, H. R., R. M Prins, et al. (2005). "Tumor immunology, immunomics and targeted immunotherapy for central nervous system malignancies". Neurol Res 27(7):692-702.
- Kemper, E. M., W. Boogerd, et al. (2004). "Modulation of the blood-brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours?" Cancer Treat Rev 30(5): 415-23.

- Kim, J., D. I. Kim, et al. (2008). "Imaging of the inflammatory response in reperfusion injury after transient cerebral ischemia in rats: correlation of superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging with histopathology". Acta Radiol 49(5):580-8.
- Kleihues, P., D. N. Louis, et al. (2002). "The WHO classification of tumors of the nervous system". J Neuropathol Exp Neurol 61(3): 215-25.
- Kleihues, P. and L. H. Sobin (2000). "World Health Organization classification of tumors". Cancer 88(12): 2887.
- Kleihues, P., F. Soylemezoglu, et al. (1995). "Histopathology, classification, and grading of gliomas". Glia 15(3): 211-21.
- Koering, C. E., T. Dupressoir, et al. (1994). "Induced expression of the conditionally cytotoxic herpes simplex virus thymidine kinase gene by means of a parvoviral regulatory circuit". Hum Gene Ther. 5(4): 457-63.
- Köchli, V. D., Marincek, B. (1998). Wie funktioniert MRI ?? Springer, Berlin .
- Knollmann, F. D., J. C. Bock, et al. (1998). "Differences in predominant enhancement mechanisms of superparamagnetic iron oxide and ultrasmall superparamagnetic iron oxide for contrast-enhanced portal magnetic resonance angiography: preliminary results of an animal study original investigation". Invest Radiol. 33: 637-643.
- Kratzer, I., A. Wernig, et al. (2007). "Apolipoprotein A-I coating of protamine-oligonucleotide nanoparticles increases particle uptake and transcytosis in an in vitro model of the blood-brain barrier". J Control Release. 117(83): 301-11. Epub 2006 Nov 28.
- Kreth, F. W., P. C. Warnke, et al. (1993). "Surgical resection and radiation therapy versus biopsy and radiation therapy in the treatment of glioblastoma multiforme". J Neurosurg 78(5): 762-6.
- Krietsch, A. M. (1998). "Einsatz von interstitiell appliziertem Eisendextran für die magnetresonanztomographische Darstellung von Lymphknoten beim Meerschwein". Vet.med. Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin.

- Kunstfeld, R., S. Strieth, et al. (2003). "Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes diminishes tumor angiogenesis and melanoma growth in a "humanized" SCID mouse model". J Invest Dermatol 120:476-482.
- Lacroix, M., D. Abi-Said, et al. (2001). "A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival." J Neurosurg 95(2): 190-8.
- Laperriere, N., L. Zuraw, et al. (2002). "Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review". Radiother Oncol 64(3): 259-73.
- Lawaczeck, R., H. Bauer, et al. (1997). "Magnetic iron oxide particles coated with carboxydextran for parenteral administration and liver contrasting. Pre-clinical profile of SH U555A". Acta Radiol 38(4 Pt 1): 584-97.
- LeCesne, A., T. Dupressoir, et al. (1993). "Intra-lesional administration of live virus, parvovirus H-1 (PVH-1) in cancer patients: A feasibility study". Proc Ann Meet Am Soc Clin Oncol 12(297).
- LeCouteur, R. A. (1999). "Current concepts in the diagnosis and treatment of brain tumors in dogs and cats". J Small Anim Practice 40, 411-416.
- Leon, S. P., R. D. Folkerth, et al. (1996). "Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors". Cancer 77, Nr. 2, 362-372.
- Lesniak, M. S., U. Upadhyay, et al. (2005). "Local delivery of doxorubicin for the treatment of malignant brain tumors in rats". Anticancer Res. 25(6B):3825-31.
- Liebner, S., A. Fischmann, et al. (2000). "Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme". Acta Neuropathol 100: 323-331.
- Lindl T., Gstraunthaler G. (2008). "Zell- und Gewebekultur". (6.Auflage) Spektrum Akademischer Verlag
- Lipsitz, D., R. J. Higgins, et al. (2003). "Glioblastoma multiforme: clinical findings, magnetic resonance imaging, and pathology in five dogs". Vet Pathol 40(6): 659-69.

- Lu, W., YZ. Tan, et al. (2005). "Cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle with its transcytosis ability and little toxicity against blood-brain barrier". Int J Pharm 13; 295 (1-2): 247-60.
- Lu, W, J. Wan, et al. (2007). "Aclarubicin-loaded cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticle for glioma chemotherapy in rats". Int J Cancer 15; 120(2): 420-31.
- Luis, D. N, H. Oghaki, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system". Acta Neuropathol 114: 97-109.
- Maier-Hauff, K., R. Rothe, et al. (2007). "Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme". J Neurooncol 81(1):53-60. Epub 2006 Jun 14.
- McLachlan, S. J., M. R. Morris, et al. (1994). "Phase I clinical evaluation of a new iron oxide MR contrast agent". J Magn Reson Imaging 4(3): 301-7.
- Martin, V., E. Liu, et al. (2009). "Encountering and advancing through antiangiogenesis therapy for gliomas". Curr Pharm Des 15(4):353-64.
- Moore, A. R. Weissleder, et al. (1997). "Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages". J Magn Reson Imaging 7(6):1140-5.
- Moore, A., E. Marecos, et al. (2000). "Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model". Radiology 214(2):568-74.
- Muller, M., P. Reimer, et al. (1998). "[T1-weighted dynamic MRI with new superparamagnetic iron oxide particles (Resovist): results of a phantom study as well as 25 patients]". Rofo 168(3): 228-36.
- Muldoon, L. L., S. Manninger, et al. (2005). "Imaging, distribution, and toxicity of superparamagnetic iron oxide magnetic resonance nanoparticles in the rat brain and intracerebral tumor". Neurosurgery 57(4):785-96.
- Nabors, L. B., T. Mikkelsen, et al. (2007). "Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma". J Clin Oncol 25(13): 1651-7.

- Nanda, D., R. Vogels, et al. (2001). "Treatment of malignant gliomas with a replicating adenoviral vector expressing herpes simplex virus-thymidine kinase". Cancer Res. 2001 15;61(24): 8743-50.
- Natsume, A., J. Yoshida. (2009)."Gene therapy for high-grade glioma: current approaches and future directions". Cell Adh Migr 2(3):186-91. Epub 2008 Jul 13.
- Neglia, J. P., A. T. Meadows, et al. (1991). "Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood". N Engl J Med 325(19): 1330-6.
- Neuhaus, J. (1999). "Orthogonal arrays of particles in astroglial cells: quantitative analysis of their density, size and correlation with intramembranous particle". Glia 3: 241-251.
- Niendorf, H. P. und T. Balzer. (1997). Kontrastmittel. In: Magnetresonanztomographie. M. Reiser und W. Semmler (Hrsg.) 2.Auflage. Springer. Berlin. 95-113.
- Norden, A. D., J. Drappatz, et al. (2008). "Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas". Lancet Neurol 7(12): 1152-60.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Epidemiology and etiology of gliomas". Acta Neuropathol (Berl) 109(1): 93-108.
- Ohshima, T., M. Iwama, et al. (1998). "Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection". J Gen Virol 79 (Pt 12): 3067-71.
- Okada, H., G. Kohanbash, et al. (2009). "Immunotherapeutic approaches for glioma". Crit Rev Immunol 29(1):1-42.
- Oswald, P., O. Clement, et al. (1997). "Liver positive enhancement after injection of superparamagnetic nanoparticles: respective role of circulating and uptaken particles". Magn Reson Imaging 15(9): 1025-31.
- Parney, I. F, C. H. Hao, et al. (2000). "Glioma immunology and immunotherapy". J Neurosurg 46,4: 778-792.

- Moore, A. R. Weissleder, et al. (1997). "Uptake of dextran-coated monocrySTALLINE iron oxides in tumor cells and macrophages". J Magn Reson Imaging 7(6):1140-5.
- Patchell, R. A., W. F. Regine, et al. (2002). "A phase I trial of continuously infused intratumoral bleomycin for the treatment of recurrent glioblastoma multiforme". J Neurooncol 60(1):37-42.
- Patel, M. M., B. B. Goyal, et al. (2009). "Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery". CNS Drugs 23(1): 35-58.
- Petri, B., A. Bootz, et al. (2006). "Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants". J Control Release 22;117(1): 51-8. Epub 2006 Oct 21.
- Pilgrimm, H. (1997). "Superparamagnetic particles with increased R1 relaxivity, their production and their use". Patent. WO 9735200.
- Poek, K., Hacke, W. (2001). Neurologie 11. Auflage. Springer. Berlin.
- Posner, J. B. (1973). "Reservoirs for intraventricular chemotherapy". N Engl J Med 25; 288(4): 212.
- Prados, M. D. and V. Levin (2000). "Biology and treatment of malignant glioma". Semin Oncol 27(3 Suppl 6): 1-10.
- Prince, M. R., Zhang, H.L., Chabra, S.G., Jacobs, P., Wang, Y. (2003). "A pilot investigation of new superparamagnetic iron oxide (ferumoxytol) as a contrast agent for cardiovascular MRI". Science Tech 11: 231-240.
- Pulfer, S. K., SL. Cicotto et al. (1999). "Distribution of small magnetic particles in brain tumor-bearing rats". J Neurooncol 41(2): 99-105.
- Purcell, E. M., H. C. Torrey, et al. (1946). "Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid". Phys Rev 69: 37-38.
- Rainov, N. G. (2000). "A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radia-

- tion in adults with previously untreated glioblastoma multiforme". Hum Gene Ther 11(17): 2389-401.
- Rainov, N. G., A. Söling. (2009). "Clinical studies with targeted toxins in malignant glioma". Rev Recent Clin Trials 1(2):119-31.
- Ramm, B., Semmler, W., Laniado, M. (1986). Einführung in die MR-Tomographie. 3. Auflage. 14-20. Springer. Berlin.
- Rath, P., H. Shi, et al. (2009). "Stem cells as vectors to deliver HSV/tk gene therapy for malignant gliomas". Curr Stem Cell Res Ther. 4(1):44-9.
- Reifenberger, G., V. P. Collins. (2004). "Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas". J Mol Med 82:656-70.
- Reimer, P. and R. Weissleder (1996). "[Development and experimental use of receptor-specific MR contrast media]". Radiologe 36(2): 153-63.
- Reimer, P., R. Weissleder, et al. (1991). "Asialoglycoprotein receptor function in benign liver disease: evaluation with MR imaging". Radiology 178(3): 769-74.
- Reimer, P., R. Weissleder, et al. (1990). "Receptor imaging: application to MR imaging of liver cancer". Radiology 177(3): 729-34.
- Reinhold, I., D. Domke, et al. (2008). "Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy". Eur J Pharm Biopharm 70(2):627-32. Epub 2008 Jun 5.
- Reiser M. und W. Semmler. (1997). Magnetresonanztomographie 2.Auflage. 17-21. Springer. Berlin.
- Renshaw, P. F., C. S. Owen, et al. (1986). "Immunospecific NMR contrast agents". Magn Reson Imaging 4(4): 351-7.
- Reynolds, F., R. Weissleder, et al. (2005). "Protamine as an efficient membrane-translocating peptide". Bioconjugate Chem 16, 1240-1245.

- Roggendorf, W., S. Stupp, et al. (1996). "Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors". Acta Neuropathol 92(3):288-93
- Rubin, G. J., G. Hahn, et al. (2006). "Are some people sensitive to mobile phone signals? Within participants double blind randomised provocation study". Bmj 332(7546): 886-91.
- Rumor, D. (1996). Eisenoxidpartikel als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie: in vitro- und in vivo-Untersuchung zur Abhängigkeit der bildgebenden Eigenschaften von der Konzentration und der Partikelgröße. Vet.med. Dissertation Berlin, Freie Universität Berlin.
- Schellenberger, E., J. Schnorr, et al. (2008). "Linking proteins with anionic nanoparticles via protamine: ultrasmall protein-coupled probes for magnetic resonance imaging of apoptosis". small 4, no. 2, 225-230.
- Schild, H.H. (1997). MRI made easy. 2-12. Schering AG.
- Shan, K., A. M. Lincoff, et al. (1996). "Anthracycline-induced cardiotoxicity". Ann Intern Med 125, 47-58.
- Saini, M., M. Bellinzona, et al. (1999). "Morphometrical characterization of two glioma models in the brain of immunocompetent and immunodeficient rats". J Neurooncol 42(1): 59-67.
- Saini, S., D. D. Stark, et al. (1987). "Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for enhanced detection of liver carcinoma". Radiology 162(1 Pt 1): 217-22.
- Sakariassen, P. O., L. Prestegarden, et al. (2006). "Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells". Proc Natl Acad Sci U S A 103(44): 16466-71.
- Salzman, M. (1988). "Surgical resection of malignant brain tumors: who benefits?" Oncology (Williston Park) 2(8): 47-56, 59-60, 63.
- Salzman, M. (2001). "Complications of cervical spine surgery". Crit Care Med 29(10): 2027-8.

- Schlegl, U. u. W. O. D. (2001). Gehirntumoren-Die blauen Ratgeber 8. Bonn, Deutsche Krebshilfe e.V.
- Schmidt, H. (1987). Kontrastmittel. In: Lissner, J., M. Seiderer (Hrsg.): Klinische Kernspintomographie. Stuttgart. Ferdinand Enke Verlag. 95-105.
- Schmidt, M. C., S. Antweiler, et al. (2002). "Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma". J Neuropathol Exp Neurol 61(4): 321-8.
- Schmidt, N. O., M. Ziu, et al. (2004). "Antiangiogenic therapy by local intracerebral microinfusion improves treatment efficiency and survival in an orthotopic human glioblastoma model". Clin Cancer Res 10, Nr. 4, 1255-1262.
- Schnorr, J., S. Wagner, et al. (2002). "Preclinical characterization of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as a blood pool contrast medium for MR angiography". Acad Radiol 9 Suppl 2: S307-9.
- Schulze, E., J. T. Ferrucci, Jr., et al. (1995). "Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro". Invest Radiol 30(10): 604-10.
- Seiderer, M., Krimmel, K., Vogel, T., Schmidt, H. (1987). Technischer Teil, A Grundlagen und Technik. In: Lissner, J., M. Seiderer (Hrsg.): Klinische Kernspintomographie. Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag.
- Semmler, W. (1997). Physikalische Grundlagen. In: Magnetresonanztomographie. M. Reiser und W. Semmler (Hrsg.) 2.Auflage. Springer. Berlin. 6-26.
- Shapiro, W. R. (1986). "Therapy of adult malignant brain tumors: what have the clinical trials taught us?" Semin Oncol 13(1): 38-45.
- Shimamura, T., S. R. Husain, et al. (2006). "The IL-4 and IL-13 pseudomonas exotoxins: new hope for brain tumor therapy". Neurosurg Focus 15;20(4):E11.
- Simon, G, H. Daldrup-Link, et al., (2006). "MRT der Arthritis mit dem USPIO SHU 555 C: Optimierung des T1-Enhancements". Fortschr Röntgenstr 178:200-206.

- Speck, U., F. Bohle, et al. (1998). "Delayed hypersensitivity to X-ray CM: possible mechanisms and models". Acad Radiol 5 Suppl 1: S162-5; discussion S166.
- Steiniger, CJ., J. Kreuter, et al. (2004). "Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles". Int J Cancer 109: 759-767.
- Steltzer, K. J., K. I. Sauve, et al. (1997). "Corpus Callosum involvement as a prognostic factor for patients with high-grade astrocytoma". Int J Radiat Oncol Biol Phys 38: 27-30.
- Stoica, G., H. T. Kim, et al. (2004). "Morphology, immunohistochemistry, and genetic alterations in dog astrocytomas". Vet Pathol 41(1): 10-9.
- Strieth, S., ME. Eichhorn, et al. (2008). "Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes increases tumor microvessel leakiness and improves therapeutic efficacy in combination with Cisplatin". Clin Cancer Res 15; 14(14): 4603-11.
- Stupp, R., W. P. Mason, et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma". N Engl J Med 352(10): 987-96.
- Stupp, R., H. E. Hegi, et al. (2009). "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial". Lancet Oncol 10(5):459-66. Epub 2009 Mar 9.
- Syed, A., A. Enam. Malignant Gliomas. In: Bernstein und Berger (Hrsg.): Neuro-oncology. The Essentials. Thieme Verlag. Auflage: 2nd revised edition (Rev), 2007. S.309-310.
- Tabatabai, G., B. Frank, et al. (2006). "Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12". Brain 129(Pt 9): 2426-35.
- Tanaka, S., I. Kobayashi, et al. (2001). "Drug-resistance gene expression and progression of astrocytic tumors". Brain Tumor Pathol 18(2):131-7.
- Taupitz, M., S. Schmitz, et al. (2003). "[Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development]". Rofo 175(6): 752-65.

- Taupitz, M., J. Schnorr, et al. (2000). "New generation of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as contrast medium for MR angiography: preclinical results in rats and rabbits". J Magn Reson Imaging 12(6): 905-11.
- Terasaki, M., E. Buffet, et al. (2008). "Pilot trial of the rate of response, safety, and tolerability of temozolomide and oral VP-16 in patients with recurrent or treatment-induced malignant central nervous system tumors". Surg Neurol 69(1):46-50.
- Thorsen, F., L. Erslund, et al. (2003). "Imaging of experimental rat gliomas using a clinical MR scanner". J Neurooncol 63(3): 225-31.
- Tombach, B, P. Reimer, et al. (2002). "First- pass and equilibrium phase MRA following intravenous bolus injection of SH U 555 C: Phase I clinical trial in elderly volunteers with risk factors for arterial vascular disease". Acad Radiol 9:425-427.
- Tombach, B, P. Reimer, et al. (2004). " First-pass and equilibrium-MRA of the aortoiliac region with a superparamagnetic iron oxide blood pool MR contrast agent (SHU 555 C): results of a human pilot study". NMR Biomed 17(7):500-6.
- Toolan, H. W., E. L. Saunders, et al. (1965). "H-1 Virus Viremia in the Human". Proc Soc Exp Biol Med 119: 711-5.
- Tran, T. T., M. Uhl, et al. (2007). "Inhibiting TGF-beta signaling restores immune surveillance in the SMA-560 glioma model". Neuro Oncol 9(3): 259-70.
- Tseng, S. H., S. M. Ling, et al. (2004). "Reveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats". Clin Cancer Res 10, Nr. 6, 2190-2202.
- Ulmer, S., M. Reeh, et al. (2008). "Dynamic contrast-enhanced susceptibility-weighted perfusion MRI (DSC-MRI) in a glioma model of the rat brain using a conventional receive-only surface coil with a inner diameter of 47 mm at a clinical 1.5 T scanner". J Neurosci Methods 30; 172(2):168-72.
- Virchow, R. (1864-65). "Die krankhaften Geschwülste". Band I-III. Hirschwald. Berlin.

- von Deimling, A., D. N. Louis, et al. (1992). "Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme". J Neurosurg 77(2): 295-301.
- von Deimling, A., D. N. Louis, et al. (1992). "Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas". Cancer Res 52(15): 4277-9.
- Vredenburgh, J. J., A. Desjardins, et al. (2007). "Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma". Clin Cancer Res 13(4): 1253-9.
- Wacker, FK, K. Reither, et al., (2003). "MR image-guided endovascular procedures with the ultrasmall superparamagnetic iron oxide SHU 555 C as an intravascular contrast agent: study in pigs". Radiology 226:459-464.
- Wagner, S., J. Schnorr, et al. (2002). "Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: preclinical in vivo characterization". Invest Radiol 37(4): 167-77.
- Weissleder, R., D. D. Stark, et al. (1989). "Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity". Am J Roentgenol 152: 167-173.
- Weissleder, R., G. Elizondo, et al. (1990). "Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging". Radiology 175(2): 494-8.
- Weissleder, R., A. S. Lee, et al. (1991). "Polyclonal human immunoglobulin G labeled with polymeric iron oxide: antibody MR imaging". Radiology 181(1): 245-9.
- Weissleder, R., A. S. Lee, et al. (1992). "Antimyosin-labeled monocrystalline iron oxide allows detection of myocardial infarct: MR antibody imaging". Radiology 182(2): 381-5.
- Weinmann, R., H. Gries. (1991). "Paramagnetische Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie. In: Günther, R. W., Gockel, H. P. (Hrsg.). Jahrbuch Radiologie. Springer. Berlin. 124 ff.

- Weinmann, H. J. (1997). "Characteristics of Gd-DTPA dimeglumine. In: Monograph Magnetist. 2. Auflage. Blackwell. Berlin. 62-65.
- Weishaupt, D., V. D. Köchli und B. Marincek. (2006). "Wie funktioniert MRI?". Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung. 5. Auflage. Springer. Berlin.
- Weizsaecker, M., D. F. Deen, et al. (1981). "The 9L rat brain tumor: description and application of an animal model". J Neurol 224(3): 183-92.
- Weller, M. (2005). "Standards and new developments in the chemotherapy of glioblastomas". Dtsch Med Wochenschr 130(40):2270-4.
- Weller, M. (2008). "Chemotherapy for brain tumors in adult patients". Nervenarzt 79(2): 231-41.
- Westphal, M., Z. Ram, et al. (2006). "Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial". Acta Neurochir (Wien) 148(3): 269-75; discussion 275.
- Wilkins, DE., GP. Raaphorst, et al. (1995). "Correlation between Gd-enhanced MR imaging and histopathology in treated and untreated 9L rat brain tumors". Magn Reson Imaging 13(1)89-96.
- Wolburg, H. (1995). "Orthogonal arrays of intramembranous particles: a review with special references to astrocytes". J Hirnforsch 36: 239-258.
- Wood, J. R., S. B. Green, et al. (1988). "The prognostic importance of tumor size in malignant gliomas: a computed tomographic scan study by the Brain Tumor Cooperative Group". J Clin Oncol 6(2): 338-43.
- Yamashita, T., M. Ninomiya, et al. (2006). "Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum". J Neurosci 26(24): 6627-36.
- Zhou, S. F. (2008). "Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition". Xenobiotica 38(7-8):802-32.

Zimmer, C., R. Weissleder, et al. (1995). "MR imaging of phagocytosis in experimental gliomas". Radiology 197(2):533-8.

Zülch, K. J. (1986). Brain Tumours. Springer. Berlin (u.a.).

10 Anhang

Hier erfolgt die Auflistung der verwendeten Rohdaten in Tabellenform.

Mitosehäufigkeit

Tiernummer	häufig	vereinzelt	keine
19	+		
22	+		
24	+		
25		+	
27		+	
28	+		
29		+	
30	+		
31	+		
32	+		
33	+		
34	+		
35		+	
36	+		
38		+	
40	+		
41	+		
42	+		
43		+	
44	+		
45	+		
46	+		
47		+	
48	+		
50	+		
51		+	
52	+		
54	+		
55	+		
56		+	

Berechnung des SNR in den Tumoren der 60 Ratten

In den nachfolgenden Tabellen steht "Tu.m." für den Mittelwert (m=median) im ROI, dass im Tumorgewebe platziert/gemessen wurde und "T.sd." für die Standardabweichung (=sd) in diesem ROI. "R.sd." steht für die Standardabweichung in der ROI vom gemessenen Rauschen

Tier	Gruppe	Applikation	Tu.m.2	Tu.sd.2	R.m.2	R.sd.2	SNR.Tu.2
19	1	1	249,9	58,34	75,48	18,6	3,31
30	1	1	329,22	76,82	48,08	12,56	6,85
38	1	1	403,69	45,17	49,96	15,02	8,08
46	1	1	309,08	50,75	47,09	12,33	6,56
47	1	1	462,62	48,1	46,63	11,88	9,92
29	2	2	459,29	205,21	46,15	12,27	9,95
32	2	2	405,52	29,89	44,53	12,1	9,11
33	2	2	471,58	35,78	49,35	13,52	9,56
40	2	2	409,57	103,99	48,31	12,17	8,48
48	2	2	333,97	80,03	46,8	10,61	7,14
31	3	1	488,57	40,32	47,82	11,84	10,22
34	3	1	359,44	34,04	47,55	12,75	7,56
36	3	1	399,74	41,77	50,29	13,29	7,95
44	3	1	527,97	20,4	49,69	12,42	10,63
50	3	1	483,23	24,22	45,56	12,32	10,61
22	4	2	472,47	34,49	72,99	20,57	6,47
25	4	2	337,45	124,45	48,01	13,4	7,03
35	4	2	317,48	42,94	52,44	13,7	6,05
41	4	2	471,94	27,44	48,31	12,53	9,77
42	4	2	392,39	58,1	48,32	13,37	8,12
24	5	2	242,48	141,22	45,78	12,49	5,30
27	5	2	486,38	57,17	47,78	13,31	10,18
28	5	2	565,12	37,51	48,34	13,12	11,69
43	5	2	415,86	46,79	49	12,95	8,49
45	5	2	432,65	54,64	48,66	13,15	8,89
51	6	2	540,91	36,01	65,08	16,95	8,31
52	6	2	465,29	38,66	46,92	11,64	9,92
54	6	2	524,94	76,59	48,76	13,19	10,77
55	6	2	315,54	163,49	51,6	13,58	6,12
56	6	2	460,46	40,84	46,2	12,19	9,97

Tier	Gruppe	Applikation	Tu.m.3	Tu.sd.3	R.m.3	R.sd.3	SNR.Tu.3
19	1	1	304,4	80,77	74,96	21,73	4,06
30	1	1	339,73	72,81	47,15	13,58	7,21
38	1	1	440,58	41,69	49,71	12,95	8,86
46	1	1	343,07	42,3	48,8	13	7,03
47	1	1	500,53	33,67	45,73	12,23	10,95
29	2	2	462,45	214,86	48,02	13,18	9,63
32	2	2	454,53	29,91	44,6	13,56	10,19
33	2	2	235,45	100,4	47,22	11,77	4,99
40	2	2	451,07	96,51	48,19	13,21	9,36
48	2	2	375,24	73,9	47,24	14,79	7,94
31	3	1	472,45	42,61	49,78	12,98	9,49
34	3	1	297,2	70,19	44,95	11,72	6,61
36	3	1	456,02	36,52	49,63	13,35	9,19
44	3	1	533,7	25,99	48,51	13,55	11,00
50	3	1	369,16	27,65	47,35	11,94	7,80
22	4	2	461,27	33,96	47,75	12,48	9,66
25	4	2	247,57	59,85	47,33	12,9	5,23
35	4	2	276,88	60,22	50,86	13,22	5,44
41	4	2	491,87	23,81	48,72	12,99	10,10
42	4	2	370,21	34,17	49,32	12,05	7,51
24	5	2	252,97	185,53	48,04	12,6	5,27
27	5	2	485,23	38,08	46,98	13,17	10,33
28	5	2	556,58	32,08	49,29	13,55	11,29
43	5	2	411,8	68,08	52,32	13,49	7,87
45	5	2	488,04	48,69	49,03	13,01	9,95
51	6	2	535,41	30,35	45,74	11,22	11,71
52	6	2	476,62	32,98	48,03	13,67	9,92
54	6	2	517,42	77,07	48,23	11,91	10,73
55	6	2	391,45	139,82	47,85	13,05	8,18
56	6	2	413,3	68,24	48,67	13,49	8,49

Tier	Gruppe	Applikation	Tu.m.4	Tu.sd.4	R.m.4	R.sd.4	SNR.Tu.4
19	1	1	227,65	63,14	70,21	18,83	3,24
30	1	1	323,96	84,96	48,53	12,37	6,68
38	1	1	468,08	45,67	47,77	11,89	9,80
46	1	1	348,81	43	46,64	10,73	7,48
47	1	1	518,32	57,1	46,52	11,73	11,14
29	2	2	446,16	185,2	47,38	12,59	9,42
32	2	2	503,76	31,33	48,81	10,4	10,32
33	2	2	547,44	62,544	48,41	11,4	11,31
40	2	2	440,76	92,72	74,77	20,05	5,89
48	2	2	397,83	55,11	46,93	11,9	8,48
31	3	1	469,07	40,07	49,15	12,14	9,54
34	3	1	280,7	74,76	46,76	13,46	6,00
36	3	1	471,35	50,34	49,37	13,52	9,55
44	3	1	523,26	34,7	49,64	11,5	10,54
50	3	1	383,47	31,36	46,15	11,96	8,31
22	4	2	257,97	36,88	48,44	12,03	5,33
25	4	2	243,85	63,61	48,43	11,64	5,04
35	4	2	256,25	73,65	48,32	12,9	5,30
41	4	2	501,66	24,56	47,98	12,3	10,46
42	4	2	359,15	37,81	48,59	12,95	7,39
24	5	2	296,08	198,58	48,7	12,12	6,08
27	5	2	488,78	33,51	46,26	12,24	10,57
28	5	2	554,67	31,84	47,4	12,41	11,70
43	5	2	404,61	60,62	51,53	12,06	7,85
45	5	2	481,08	39,77	45,43	12,61	10,59
51	6	2	530,44	33,21	46,72	10,44	11,35
52	6	2	460,73	35,6	45,55	11,49	10,11
54	6	2	507,91	71,42	43,39	10,62	11,71
55	6	2	501,03	84,94	50,12	14,28	10,00
56	6	2	396,37	76,94	46,98	11,96	8,44

Tier	Gruppe	Applikation	Tu.m.5	Tu.sd.5	R.m.5	R.sd.5	SNR.Tu.5
19	1	1	395,44	52,36	73,95	20,45	5,35
30	1	1	445,03	72,4	50,49	13,74	8,81
38	1	1	508,31	29,01	51,65	13,89	9,84
46	1	1	475,44	27,66	49,95	13,24	9,52
47	1	1	390,77	82,73	48,05	13,04	8,13
29	2	2	441,76	157,14	47,08	12,29	9,38
32	2	2	442,18	63,92	47,09	12,47	9,39
33	2	2					
40	2	2	496,21	80,47	48,97	11,95	10,13
48	2	2	431,06	57,82	46,53	12,69	9,26
31	3	1	495	19,66	48,22	12,2	10,27
34	3	1	370,51	63,8	47,22	12,43	7,85
36	3	1	560,02	35,94	48,64	13,11	11,51
44	3	1	496,8	28,04	49	13,62	10,14
50	3	1	385,66	42,65	47,3	13,19	8,15
22	4	2	502,07	28,16	51,81	13,33	9,69
25	4	2	351,14	79,94	50,82	13,56	6,91
35	4	2	292,23	57,4	46,94	12,75	6,23
41	4	2					
42	4	2	310,63	46,61	50	12,3	6,21
24	5	2	232,28	63,17	48,06	13,36	4,83
27	5	2	486,54	31,67	46,37	12,29	10,49
28	5	2	510,64	33,42	47,84	15,63	10,67
43	5	2	387,67	102,29	50,88	13,77	7,62
45	5	2					
51	6	2	503,77	30,38	46,46	13,13	10,84
52	6	2	461,64	31,02	45,12	11,16	10,23
54	6	2	500,84	58,67	44,91	10,68	11,15
55	6	2	461,61	40,56	46,66	11,12	9,89
56	6	2	479,66	45,99	66,56	15,38	7,21

Tier	diff.SNR.Tu.2/1	diff.SNR.Tu.3/1	diff.SNR.Tu.4/1	diff.SNR.Tu.5/1
19	-3,55	-2,80	-3,62	-1,51
30	-3,39	-3,03	-3,56	-1,42
38	-3,49	-2,70	-1,77	-1,73
46	-3,32	-2,86	-2,41	-0,37
47	-0,39	0,64	0,83	-2,18
29	-1,01	-1,33	-1,55	-1,58
32	-2,77	-1,68	-1,55	-2,49
33	-1,11	-5,68	0,64	-10,67
40	-2,27	-1,38	-4,85	-0,61
48	-3,15	-2,34	-1,81	-1,02
31	-2,04	-2,77	-2,71	-1,99
34	-3,89	-4,83	-5,44	-3,60
36	-3,09	-1,85	-1,49	0,48
44	0,02	0,39	-0,07	-0,47
50	0,00	-2,81	-2,30	-2,45
22	-2,68	0,50	-3,83	0,54
25	-2,63	-4,42	-4,62	-2,75
35	-3,73	-4,34	-4,48	-3,55
41	0,24	0,57	0,93	-9,52
42	-2,09	-2,71	-2,82	-4,00
24	-4,59	-4,62	-3,80	-5,05
27	-0,10	0,05	0,29	0,22
28	-0,22	-0,62	-0,21	-1,24
43	-0,86	-1,48	-1,50	-1,73
45	-0,68	0,38	1,01	-9,58
51	-2,96	0,43	0,08	-0,43
52	0,09	0,10	0,29	0,40
54	0,38	0,34	1,32	0,77
55	-2,93	-0,86	0,95	0,85
56	3,05	1,58	1,52	0,29

Zeitpunkt des maximalen Signalabfalls in Prozent aller Tiere der 6 Gruppen

VSOP-C i.a.

Tier	max. Signalabfall in %	Zeitpunkt nach Injektion
19	51%	1 Minute
30	33%	1 Minute
38	30%	1 Minute
46	33%	1 Minute
47	21%	24 Stunden

VSOP-C i.z.

Tier	max. Signalabfall in %	Zeitpunkt nach Injektion
29	14%	24 Stunden
32	32%	1 Minute
33	53%	1 Stunde
40	45%	2 Stunden
48	30%	1 Minute

VSOP-DOXO i.a.

Tier	max. Signalabfall in %	Zeitpunkt nach Injektion
31	22%	1 Stunde
34	47%	2 Stunden
36	27%	1 Minute
44	5%	24 Stunden
50	26%	1 Stunde

VSOP-DOXO i.z.

Tier	max. Signalabfall in %	Zeitpunkt nach Injektion
22	41%	2 Stunden
25	47%	2 Stunden
35	45%	2 Stunden
41	0	
42	39%	24 Stunden

Resovist S i.z.

Tier	max. Signalabfall in %	Zeitpunkt nach Injektion
24	46%	1 Stunde
27	0	
28	10%	24 Stunden
43	18%	24 Stunden
45	8%	1 Minute

VSOP-Protamin i.z.

Tier	max. Signalabfall in %	Zeitpunkt Injektion nach
51	26%	1 Minute
52	0	
54	0	
55	32%	1 Minute
56	0	

11 Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. med. B. Hamm und Herrn Professor Dr. rer. nat. U. Speck möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation bedanken. Frau Professor Dr. med. vet. J. Plendl danke ich für die engagierte Betreuung und Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön für die Hilfe bei der Auswertung der histologischen Präparate an Frau Dr. med. vet. H. Hünigen aus dem Institut für Veterinär Anatomie.

Für die statistische Betreuung bedanke ich mich bei Herrn PD. Dr.rer.nat. Dr.med. Werner Hopfenmüller aus dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. med. vet. J. Schnorr bedanken. Er unterstützte mich bei der Durchführung und Auswertung der Studie und stand mir jederzeit mit kompetenten Ratschlägen bei kleinen und größeren Problem zur Seite. Er vermittelte mir das nötige Wissen und die tierexperimentellen Fertigkeiten, um selbstständig wissenschaftlich arbeiten zu können.

Frau Monika Ebert möchte ich herzlich für die Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate und das Arbeiten an der sterilen Werkbank bedanken.

Herrn Dr. rer. medic. C. Warmuth danke ich für die Hilfe bei der Arbeit am MRT.

Frau Dr. med. vet. I. Gemeinhardt half mir bei den vielen kleinen Hürden, die es beim Schreiben dieser Arbeit zu überwinden galt. Vielen Dank für die Herzlichkeit und die Unterstützung über die Grenzen Berlins hinaus. Nicht zuletzt bedanke ich mich bei allen Kollegen der AG Taupitz und der AG Schellenberger für eine schöne Zeit.

Aufrichtig und von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir das Studium der Veterinärmedizin und somit auch das Anfertigen dieser Arbeit ermöglichten. Meiner Großmutter danke ich für die Unterstützung während des Studiums und der Zeit der Dissertation.

12 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Romina Turco

Berlin, den 24.06.2009