Aus dem Medizinischen Zentrum für Pathologie
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Moll)
Abteilung für Neuropathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. H. D. Mennel)

der Philipps-Universität Marburg und des
Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

Das Wachstum experimentell erzeugter, intrazerebral verimpfter Gliome in der Magnetresonanztomographie bei Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Nils Jurriaan Kosse

aus Offenbach am Main

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am 06.04.2006. Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Herr Prof. Dr. med. Hans Dieter Mennel

Koreferent: Herr Dr. med. Klaus Jochen Klose

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

1 Einleitung 7
1.1 Problemstellung 7
1.2 Hirntumoren I 8
1.2.1 Die Problematik der Klinik der Hirntumoren 8
1.2.2 Stellung der Hirntumoren in der Onkologie-Epidemiologie 9
1.2.3 Klassifikation und Grading 10
1.2.4 Diagnostik 13
1.2.4.1 Computertomographie 13
1.2.4.2 Magnetresonanztomographie 13
1.2.4.3 Nuklearmedizinische Methoden 13
1.2.4.4 Hirnbiopsie und Histologie 14
1.2.4.5 Liquoruntersuchung 14
1.2.4.6 Tumormarker 14
1.2.4.7 Elektrophysiologie 14
1.3 Hirntumoren II 14
1.3.1 Gliome (Neuroepitheliale Tumoren) 14
1.3.1.1 Epidemiologie 15
1.3.2 Astrozytäre Tumoren 15
1.3.2.1 Pilozystisches Astrozytom (Grad I) 15
1.3.2.2 Astrozytom (Grad II) 16
1.3.2.3 Anaplastisches (malignes) Astrozytom (Grad III) 16
1.3.2.4 Glioblastom (Grad IV) 16
1.3.3 Oligodendrogliale Tumoren (Oligodendrogliome Grad II) 17
1.3.4 Ependymäre Tumoren 17
1.3.5 Weitere Tumoren des Nervensystems 18
1.4 Modelle bei Hirntumoren 18
1.4.1 Grundlagen der Modelltheorie 18

1.4.2 Die wichtigsten Modelle der experimentellen Erzeugung von Hirntumoren 19
1.4.2.1 Nicht-neurogene intrazerebrale Tumoren 19
1.4.2.2 Xenotransplantate 20
1.4.2.3 Virusinduktion 20
1.4.2.4 Transgene Mäuse 21
1.4.2.5 Trauma 21
1.4.2.6 Hormone 21
1.4.2.7 Strahlen 22
1.4.2.8 Chemische Substanzen 23
1.4.2.8.1 Topische Applikation 24
1.4.2.8.2 Resorptive Gabe 24
1.4.2.8.2.1 Chronische resorptive Gabe 24
1.4.2.8.2.2 Einmalige Gabe 25
1.4.2.8.2.2.1 Am adulten Tier 25
1.4.2.8.2.2.2 Am neugeborenen und jungen Tier 25
1.4.2.8.2.2.3 Transplazentare Gabe 26
1.4.3 Verschiedene Experimental-Modelle zur Untersuchung von Hirntumoren 28
1.4.3.1 Transplantationstumorlinie 29
1.4.4 Ein neues Modell zur Wachstumskontrolle 30
1.5 Magnetresonanztomographie 31
1.5.1 Historische Entwicklung 31
1.5.2 Physikalische Grundphänomene der MRT 32
1.5.3 Indikationen für die MRT bei Hirntumoren 32
1.6 Watershed Transform 33
1.7 Ziel der Arbeit 34

2 Material und Methodik....35
2.1 Material....35
2.1.1 Versuchstiere....35
2.1.2 Tumorzelllinie....35
2.1.3 Substanzen....36
2.1.3.1 ÄNH....37
2.1.3.2 DMSO....38
2.1.4 Technische Ausrüstung....38
2.1.5 Medikamente....40
2.1.6 Lösungen....41
2.2 Methoden....41
2.2.1 Primärinduktion des Transplantationstumors....41
2.2.2 Serielle Verimpfung....42
2.2.3 Intrazerebrale Verimpfung....43
2.2.4 MR - Untersuchung....45
2.2.5 Interactive Watershed Transform....46
2.2.6 Fixierung und Einbettung von Biopsiematerial für die Histologie....46
2.2.7 Hämalaun Eosin Färbung der Paraffinschnitte....47
2.2.8 Kresylviolettfärbung der Paraffinschnitte (Nissl-Färbung)....47
2.2.9 Färben mit der Immunperpoxidase Färbemethode....48
2.2.10 Lichtmikroskopische Morphometrie....49
2.2.11 Statistische Auswertungsmethodik....50
2.2.11.1 Trendtest....50
2.2.11.2 Bland-Altman-Diagramm....50
3 Ergebnisse....53
3.1 Primärtumorinduktion....53
3.1.1 Primärtumorinduktionszeiten....53

3.1.2 Deskriptive morphologische Ergebnisse der Histologie (Primärtumor) 53

3.1.3 Makroskopische Befunde 54

3.1.4 Mikroskopische Befunde 55

3.2 Tumortransplantation.....58

3.2.1 Induktionszeiten der Transplantationstumoren 58

3.2.2 Deskriptive morphologische Ergebnisse der Histologie (Transplantationstumoren) 60

3.2.3 Makroskopische Befunde 60

3.2.4 Mikroskopische Befunde 61

3.3 Deskriptive morphologische Ergebnisse der bildgebenden Verfahren.....65

3.3.1 MRT Aufnahmen 65

3.3.2 Bearbeitete MRT-Aufnahmen mit Hilfe der IWT-Software.....69

3.4 Quantitative Ergebnisse.....73

3.4.1 Lichtmikroskopische Morphometrie 73

3.4.2 IWT 75

3.4.3 Vergleich beider Methoden.....77

4 Diskussion 79

4.1 Allgemeines 79

4.2 Verlaufsuntersuchungen 79

4.2.1 Vorausgegangene Untersuchungen am Rattenhirn 79

4.2.2 Vergleich mit den eigenen Resultaten.....79

4.3 Morphologische Befunde.....81

4.3.1 Morphologie der ersten zwölf Passagen 81

4.3.2 Morphologie höherer Passagen.....82

4.3.3 Transplantationstechnik 82

4.4 Die Methode der lichtmikroskopischen Morphometrie.....83

4.5 Die Methode der vollautomatischen Bildanalyse (IWT) 84
4.6 Eignung des verwendeten Tumormodells 85
4.7 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Bereiche 86
5 Zusammenfassung 88
6 Literaturverzeichnis 90
7 Anhang 98
7.1 Tabellen 98
7.1.1 Volumen Messwerte der lichtmikroskopischen Morphometrie 98
7.1.2 Volumen-Messwerte der CISS-Aufnahmen berechnet mit der IWTTechnik 99
7.1.3 Volumen-Messwerte der DESS-Aufnahmen berechnet mit der IWT-Technik 100
7.1.4 Dosierungstabellen der Anästhetika 101
7.1.5 Verimpfungsprotokoll der Transplantationstumorlinie G-XIX 103
7.1.6 MRT-Aufnahmenprotokolle 104
7.1.6.1 Primärtumoren 104
7.1.6.2 Transplantationstumoren G-XIX-1 105
7.1.6.3 Transplantationstumoren G-XIX-2 105
7.1.6.4 Transplantationstumoren G-XIX-3 105
7.1.6.5 Transplantationstumoren G-XIX-4 106
7.1.6.6 Transplantationstumoren G-XIX-5 106
7.1.6.7 Transplantationstumoren G-XIX-6 108
7.1.6.8 Transplantationstumoren G-XIX-7 108
7.1.6.9 Transplantationstumoren G-XIX-8 108
7.1.6.10 Transplantationstumoren G-XIX-9 109
7.1.6.11 Transplantationstumoren G-XIX-10 109
7.1.6.12 Transplantationstumoren G-XIX-11 109

7.1.6.13 Transplantationstumoren G-XIX-12 110

8 Lebenslauf 111

9 Meine Akademischen Lehrer 112

10 Ehrenwörtliche Erklärung 116

11 Danksagung 117

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Hirntumoren bei Ratten, die den supratentoriellen menschlichen Gliomen des Erwachsenenalters morphologisch ähnlich sind, können seit den Sechzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts auf systemischem Weg problemlos erzeugt werden (DRUCKREY, 1967). Bei transplazentarer Induktion beträgt die Latenz mehrere Monate, so dass sich dieses Modell nur bedingt zu Wachstumskontrolluntersuchungen eignet, wohl aber daraus gewonnene Transplantationstumoren, die innerhalb von Wochen wachsen (MENNEL, 1978). Intrazerebral auf syngene Tiere verimpfte Gliome führen innerhalb von 10 – 3 Wochen, je nach Passage, zum Tod der Tiere. Untersuchungen zeigten, dass entsprechende therapeutische Maßnahmen die mittlere Überlebenszeit verlängern können (TAMURA, 1979).

Damit war ein Tumormodell gewonnen, dass zwei wichtige Parameter in sich vereinigte. Erstens waren die Tumoren nach Morphologie und Induktionsart am ehesten mit menschlichen Hirntumoren zu vergleichen. Und zweitens war das Transplantationstumormodell aufgrund der Kürze der Induktionszeit und der Möglichkeit, viele Versuchstiere gleichzeitig zu beobachten und zu behandeln, gut geeignet zu sinnvollen Versuchseinsätzen.

Die Beurteilung des Wachstumsverhaltens solcher intrazerebral verimpfter Geschwülste während der Behandlung war indes schwierig. Diese Tumoren wurden zwar in älterer und jüngerer Zeit mit den unterschiedlichsten Methoden untersucht (MENNEL, 1988; KAPPLER, 1999), nicht zuletzt neuroradiologisch (SCHUMACHER, 1980), jedoch setzten diese Methoden in der Regel die Tötung der Versuchstiere voraus.

Die Einführung bildgebender Verfahren und ihre Anwendung auf kleine Tiere erlaubt nunmehr jedoch die Untersuchung des Wachstums solcher Tumoren in-vivo in kurz aufeinander folgenden Abständen. Damit ist es möglich, das Wachstum der Tumoren unter unbeeinflussten Bedingungen und im Rahmen therapeutischer Protokolle direkt zu verfolgen.

Diese erste Arbeit über eine systematisch Untersuchung intrazerebral verimpfter , experimentell erzeugter Tumoren in den ersten 12 Passagen nach Primärinduktion sollte vor allem die Frage der Heterogenität des intrazerebralen Wachstums in den verschiedenen Passagen untersuchen. Es war in diesem und ähnlichen Modellen bekannt, dass sich das

Tumorwachstum im Verlauf der ersten 12 Transplantationsgenerationen von etwa 10 auf 3 Wochen beschleunigt (MENNEL, 1994), allerdings mit beträchtlichen Schwankungen in den aufeinanderfolgenden Passagen. Hier kann die in-vivo-Untersuchung Aufschluss darüber geben, ob dies sich in der Entwicklung der Tumorgröße nachvollziehen lässt.

Auch die Morphologie ändert sich während der zunehmenden Verkürzung der Induktionszeiten, sodass das Endergebnis bezüglich Lokalisation und Form, vor allem aber bezüglich der Histologie mit der Wachstumsdynamik in den einzelnen Passagen zu vergleichen war. Die hier berichteten Untersuchungen bilden die Grundlage für weiterführende Protokolle, in denen das Tumorwachstum in-vivo unter therapeutischen Strategien beurteilt und damit möglicherweise klinisch nutzbar gemacht wird.

1.2 Hirntumoren I

1.2.1 Die Problematik der Klinik der Hirntumoren

Die knöchernen Strukturen, die das Gehirn zum Schutz umgeben, sind ein starres Behältnis mit einem Fassungsvermögen von ca. 1500-1800 ml. Der begrenzten Raum wird mit etwa 1200-1300 ml Gehirngewebe, etwa 150 ml Liquor, etwa 200 ml Blut und ca. 20-50 ml anderer Gewebe, wie z. B. Hirnhäute ausgefüllt. Wenn sich innerhalb des geschlossenen, starren Behältnisses ein zusätzliches Kompartiment entwickelt, wird zunächst der Liquor ausgepresst, weil er mit dem Rückenmarkraum in Verbindung steht. Danach wird das Blutvolumen in der Umgebung des neuen Kompartiments reduziert, aber insgesamt ergibt dies nicht viel Kompensationsmöglichkeit und geht mit einer Minderdurchblutung des umgebenden Gewebes einher. Als nächstes wird Hirngewebe verdrängt und gegen den knöchernden Schädel gepresst.

Sobald eine raumfordernde Läsion in der Schädelhöhle ein Volumen von mehr als 50 ml erreicht, bei der Ratte 20 µl, wirkt sie komprimierend auf das Hirngewebe und kann zu Funktionsstörungen, z. B. zu einer Lähmung, führen. Bei weiterer Volumenzunahme mit Komprimierung lebenswichtiger Hirnanteile, geben diese ihre Funktion auf, der Patient wird bewusstlos und kann an der raumfordernden Läsion versterben.

Wenn die Hernien in den verschiedenen Höhen nicht von sich aus zum Tod führen, wird der generalisierte Hirndruck, der sich durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und dem dadurch entstehendem Hirnödem verstärkt, den Blutdruck übersteigen. Dadurch kommt es zur Unterbrechung der zentralen Durchblutung und zur genera-

lisierten Hypoxie. Bei den Betroffenen kommt es zu Maschinenatmung und forcierter Atmung. Der Hirndrucktod tritt meist durch Atemstillstand ein.

Die Geschwindigkeit, mit der sich die raumfordernde Größe entwickelt, spielt beim zeitlichen Verlauf eine entscheidende Rolle. Bei langsamen Wachstum kann durch Kompensation ein beträchtliches Volumen erreicht werden, bevor es zu Symptomen kommt. Bei schneller Volumenzunahme entwickeln sich Symptome schon bei kleineren Volumina.

1.2.2 Stellung der Hirntumoren in der Onkologie-Epidemiologie

Da gegenwärtig in Deutschland keine vollständige, vollzählige und flächendeckende Krebsregistrierung besteht, kann die Zahl auftretender Krebserkrankungen auf nationaler Ebene weiterhin nur geschätzt werden (http://www.rki.de). Die Inzidenz von Gliomen beim Menschen, wird mit 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr geschätzt. Die Prävalenz von Hirntumoren soll bei etwa 50 pro 100.000 Einwohner liegen. Alle Hirntumoren zusammen machen etwa 7-9% der Tumorkrankheiten aus, primäre Hirntumoren etwa 5% (POECK u HACKE, 2001).

Bei Kindern stehen Hirntumore nach Leukämie, Nierentumoren und Knochentumoren an vierter Stelle. Für die Altersgruppe bis 15. Jahren steht Krebs als Todesursache nach Unfällen an zweiter Stelle (IVANKOVIC, 1975). Die Zahlen zeigen, dass der kindliche Krebs eine besondere Stellung in der experimentellen sowie der praktischen Onkologie einnimmt.

Männer leiden häufiger als Frauen unter bösartigen Hirntumoren und Metastasen. Die altersstandartisierte Mortalitätsrate von bösartigen Neubildungen des Gehirns je 100.000 (Europabevölkerung), aller Altersgruppen ist bei Männern 6,08 und bei Frauen 4,06 (http://www.rki.de).

Für Fragen auf internationaler Ebene ist die Internationale Agency for Research of Cancer in Lyon (http://www.iarc.fr) tätig. Dort findet man Schätzungen aus der weltweiten Datenbank „Globcan“ (http://www-depdb.irac.fr/globcan/GLOBOframehtm).

1.2.3 Klassifikation und Grading

Die heute angewandte Klassifikation der Hirntumoren geht auf eine von der WHO, in den 80 Jahren, empfohlene internationale Klassifikation zurück (ZÜLCH 1971 u. 1986; KLEIHUES et al. 1993).

Die in dieser Arbeit abgebildete Gliederung (Tabelle 1.1) der Tumoren stützt sich auf die revidierte WHO-Klassifikation (KLEIHUES u. CAVENEE, 2000). Diese wurde 1999 in Lyon (International Agency for Research on Cancer) von der WHO Working Group, einer Gruppe von 42 Neuropathologen ganz überwiegend aus Europa und Nordamerika, ausgearbeitet und hat die „alte“ WHO-Klassifikation von 1993 abgelöst.

Tumor-Familie	Tumor-Typ	Grad			
		I	II	III	IV
Neuroepitheliale Tumoren					
• Astrozytäre Tumoren	Pilozytisches A.	○			
	fibrilläres A.		○		
	anaplastisches A.		○	○	
	Glioblastom				○
• Oligodendrogliome	Oligodendrogliom		○		
	anaplastisches O.			○	
• Ependymale Tumoren	Ependymom	○	○		
	anaplastisches E.			○	
• Plexus-Tumoren	Plexus-Papillom	○			
	Plexus-Karzinom			○	○
• Pinealis-Tumoren	Pineozytom		○		
	Pineoblastom				○
Embryonale Tumoren (primitive neuroektodermale Tumoren)	Medulloblastom				○
Mesenchymale Tumoren	Menigeom	○			
	Hämangioperizytom	○	○		
Neuronal/gliale Tumoren	Gangliozytom	○			
	Neurozytom	○			
	Gangliogliom	○	○	○	
Nervenscheiden-Tumoren (Schwannzelltumoren)	Neurinom (Schwannom)	○			
Keimzelltumoren	Germinom			○	○
	Teratom		○	○	○
	Chorion-Ca				○
Hypophysenadenome	hormonaktiv	○			
	hormoninaktiv	○			
Kraniopharyngeome		○			

Tabelle 1. 1 **WHO-Gradeinteilung von ZNS-Tumoren**

Die Einordnung der Tumoren nach der WHO-Klassifikation hat sich inzwischen weltweit durchgesetzt.

Sie beruht auf einer morphologischen Einteilung, die histogenetische Prinzipien wie die Zelldifferenzierung und die Entwicklungsgeschichte des ZNS berücksichtigt und die Hirntumoren dem Zelltyp zuordnet, aus dem sie hervorgegangen ist.

Die Gradeinteilung der Tumoren entsprechend histopathologischer Parameter gestattet eine gewisse Vorhersage des biologischen Verhaltens und wird für die Therapieplanung und die Beurteilung der Prognose herangezogen.

Grad I	Geringe Zelldichte. Keine atypischen Mitosen. Tumordegeneration mit Verschleimung und Zystenbildung, aber ohne Nekrosen. Keine Gefäßwandproliferationen.
Grad II	Geringe bis mäßige Zelldichte. Geringe Unregelmäßigkeit der Kerne. Einige atypische mitosen. Tumordegeneration, aber ohne Nekrosen. Keine Gefäßwandproliferation.
Grad III	Erhebliche Zelldichte. Mäßige bis starke Zell- und Kernpolymorphien. Zahlreiche, auch atypische Mitosen. Degeneration und gelegentlich auch Nekrosen. Gefäßwandproliferationen mittleren Grades möglich.
Grad IV	Hohe Zelldichte mit starken Zell- und Kernpolymorphien. Zahlreiche atypische Mitosen. Flächenhafte Nekrosen. Reaktive Bindegewebsvermehrung. Starke Gefäßwandproliferation

Tabelle 1. 2 **Histologische Kriterien der Hirntumoren (WHO)**

Der Grad der Anaplasie ist ein wesentlicher Baustein bei der Malignitätsbestimmung. Die Anaplasie stellt eine Rückwärtsentwicklung der differenzierten Zelle zum entdifferenzierten Status dar. Die verschiedenen Kriterien, die bei der Bestimmung des Anaplasiegrades herangezogen werden, sind in Tabelle 1.1 zusammengefaßt.

Schwierigkeiten bei der histologischen Gradeinteilung ergeben sich aus der Tatsache, dass viele Tumoren heterogen sind und differenzierte und entdifferenzierte Gewebeanteile eng benachbart nebeneinander vorkommen. Dies kann insbesondere bei stereotaktisch gewonnenem Tumormaterial zu Fehleinschätzungen durch die Interpretation nicht repräsentativer Tumoranteile führen.

In die prognostische Bewertung der Hirntumorerkrankung müssen neben dem histopathologischen Malignitätsgrad auch der klinisch-neurologische Befund, das Lebensalter des Patienten, die Dauer der Krankheitssymptome, der Tumorsitz und radiologische Parameter wie die Abgrenzbarkeit des Tumors und das Vorkommen von Nekrosen eingehen.

1.2.4 Diagnostik

1.2.4.1 Computertomographie

Die CT erlaubt nicht nur die erste Verdachtsdiagnose eines Hirntumors, sondern gibt darüber hinaus schon gute Informationen über Lokalisation, Grad der Massenverschiebung, Begleitödem, Homogenität oder Inhomogenität des Tumors und Störungen der Bluthirnschranke (Kontrastmittelaufnahme).

1.2.4.2 Magnetresonanztomographie

Wo sie verfügbar ist, ersetzt die MRT vielerorts bereits die CT. Die beliebig wählbare Schnittführung, die genaue Analyse der Lagebeziehung, die bessere Auflösungsfähigkeit und geringere Artefaktanfälligkeit bei schädelbasisnahen Prozessen oder Hirnstammtumoren machen die MRT der CT überlegen.

Durch die Anwendung von paramagnetischen Kontrastmittel (Gadolinium-DTPA) wird die Differenzierung zwischen Tumor und Ödem, die Beurteilung der Gefäßdichte innerhalb des Tumors und die Störung der Bluthirnschranke möglich.

Insgesamt lässt sich mit der MRT heute eine hohe Voraussage der Tumorart und –dignität erreichen.

1.2.4.3 Nuklearmedizinische Methoden

Diese Methoden haben nur untergeordente Bedeutung. Man diagnostiziert Hirntumoren nicht mit der Szintigraphie. Das Knochenszintigramm kann bei der Suche nach Knochenmetastasen helfen.

Einen Beitrag zur Differentialdiagnose zwischen Strahlennekrose und Rezidivtumor liefert die Positronen-Emisionstomographie (PET).

1.2.4.4 Hirnbiopsie und Histologie

Die endgültige Artdiagnose eines Tumors wird histologisch gestellt. Bei vielen nicht operablen Tumoren ist vor Bestrahlung eine histologische Sicherung der Tumorart erwünscht. Die Hirnbiopsie wird offen, im Rahmen einer Tumorverkleinerung, oder stereotaktisch in lokaler Anaesthesie durchgeführt.

1.2.4.5 Liquoruntersuchung

Bei den meisten Hirntumoren ist der Liquor normal. Viele Tumoren führen zu einer spezifischen Eiweißerhöhung durch Blut-Hirn-Schrankenstörungen. Intrathekale Produktion von Immunglobulinen kommt praktisch nicht vor. Eine Pleozytose ist möglich, aber nicht sehr ausgeprägt.

Der Nachweis von Tumorzellen mit dem Ziel einer Artdiagnose des primären Hirntumors oder der Metastase kann den Patienten eine Hirnbiopsie ersparen.

1.2.4.6 Tumormarker

Nur bei wenigen intrakraniellen Tumoren stehen Tumormarker in Liquor oder Serum zur Diagnostik zur Verfügung Tumoren der Pinealisloge können zum Teil über den Nachweis von α-Fetoprotein, plazentare alkalische Phosphatase (PLAP) oder β-HCG im Serum und Liquor festgestellt werden. Bei hormonaktiven Hypophysentumoren sind die entsprechend erhöhten Hormonspiegel im Serum diagnostisch wichtig.

1.2.4.7 Elektrophysiologie

Die Bedeutung des EEG in der Diagnostik von Hirntumoren ist marginal. Zwar ist das EEG bei Tumoren der Großhirnhemisphären häufig uncharakteristisch verändert, man findet, je nach Verlaufsstadium einen Herdbefund, eine Allgemeinveränderung unterschiedlicher Ausprägung oder epilepsietypische Potentiale. Zur Artdiagnose trägt das EEG nichts, zur Lokalisation nur wenig bei.

1.3 Hirntumoren II

1.3.1 Gliome (Neuroepitheliale Tumoren)

In diese Hauptgruppe gehörten früher praktisch alle im Hirn vorkommende neuroepithelialen Wucherungen. Heute versteht man unter Glia nur die Astrocyten, Oligodendroglia und das Ependym. Mischtumoren mit unterschiedlich großen Anteilen der beiden Kom-

ponenten kommen als Astrooligodendrogliome oder Oligoastrozytome in ca. 10-15% aller Gliome vor.

1.3.1.1 Epidemiologie

Gliome machen etwa 30-50% der intrakraniellen Tumoren aus (BERNSTEIN u. BERGER 2000; ZÜLCH 1986). Für die USA, Nordeuropa und Israel werden Neuerkrankungsraten von 7–11 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr beschrieben, dagegen etwa für Indien und die Philippinen lediglich zwei bis vier. Inwieweit hier ethnische Einflüsse oder nur die allgemeine Verfügbarkeit medizinischer Versorgung von Bedeutung sind, ist nicht geklärt. Einige Erklärungen bietet der WHO-Report „Cancer Incidence in Five Continents“ (Vol. XII, 1993-1997).

Etwa 50% der Gliome sind Glioblastome. Astrozytome (WHO Grad I-III) machen etwa 25% aus und Oligodendrogliome weniger als 5-18%. Ependyome werden mit einer Häufigkeit von 2-9%, angegeben (RUSSELL u. RUBINSTEIN, 1989; ZÜLCH, 1986). Über die Inzidenz der Gliome, unterteilt nach Altersklassen, informiert Abbildung 1. 1. Männer sind häufiger von Gliomen betroffen als Frauen (je nach Unterart 1,2-1,9:1).

1.3.2 Astrozytäre Tumoren

Sowohl die Astrozytome wie die Oligodendrogliome können wegen der Migration von Tumorzellen in auch weit entfernte Hirnareale nicht im strengeren Sinn radikal entfernt werden. Aus diesem Grund ist auch nach „vollständiger“ operativer Tumorentfernung (z.B. nach MR-Kriterien) eine adjuvante Behandlung sinnvoll. Die Migrationsfähigkeit der Gliomzellen erklärt auch das regelmäßige Auftreten von Rezidiven bei Astrozytomem und Oligodendrogliome.

1.3.2.1 Pilozystisches Astrozytom (Grad I)

Sie sind die häufigsten Gliome des Kindes- und Jugendalters und gutartig. Sie sind mittelliniennahe meist im Kleinhirn lokalisiert und neigen zu Zystenbildung und Kalkeinlagerung.

Die zerebellären pilozytischen Astrozytome werden durch Erbrechen, Nystagmus und Ataxie manifest. Durch Druck auf den IV. Ventrikel kommt es zum Verschlusshydrozephalus. Liegen die Tumoren supratentoriell, verursachen sie epileptische Anfälle.

Im MRT sind sie scharf begrenzt, in T1-Wichtung hypo-, in T2-Wichtung hyperintens.

Nach vollständiger Resektion liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 100%. Sie nehmen aus diesem Grund unter den Gliomen eine Sonderstellung ein.

1.3.2.2 Astrozytom (Grad II)

Niedriggradige Astrozytome wachsen langsam in die Großhirnhemisphäre und neigen zu zystischer Degeneration.

Frühsymptome sind fokale epileptische Anfälle. Psychische Veränderungen sind nicht selten. Das EEG zeigt einen Herdbefund, in der MRT-Aufnahme erscheint der Tumor in T1-Wichtung hypo, in der T2-Wichtung homogen hyperintens ohne oder mit sehr geringer KM-Aufnahme.

Bei möglichst vollständiger operativer Entfernung liegt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei 40-60%. Mit jahrelanger Latenz können Rezidive auftreten, die histologisch einen höheren Malignitätsgrad aufweisen.

1.3.2.3 Anaplastisches (malignes) Astrozytom (Grad III)

Anaplastische Astrozytome wachsen schnell und infiltrierend. Sie sind im MRT unscharf begrenzt, in T1-Gewichtung hypo-, in T2-Gewichrung hyperintens.

Die Resektion gelingt nur unvollständig, sodass zusätzlich die Bestrahlung der erweiterten Tumorregion indiziert ist, wodurch die postoperative Überlebenszeit verlängert werden kann. Rezidive weisen fast regelmäßig eine höhere Malignität auf.

1.3.2.4 Glioblastom (Grad IV)

Das Glioblastome stellt die bösartigste Variante (immer Grad IV) dar. Es kann als primäres Glioblastoma multiforme (GBM) entstehen oder durch sekundäre Malignisierung aus einem Tumor niedrigeren Malignitätgrad hervorgehen. Sie breiten sich oft im Marklager des Großhirns, gelegentlich bilateral aus „Schmetterlingsgliom“.

Für das GBM sind neben einer ausgeprägten Gefäßproliferation vielfältige degenerative intratumorale Prozesse charakteristisch. In 10-12% findet man Abtropfmetastasen in den Liquor.

Der Krankheitsverlauf bei Glioblastom ist kurz. Die Symptomatik setzt meist im Alter von 55-65 Jahren mit zerebralen Herdsymptomen ein, wie epileptische Anfälle, Hemiparese, Aphasie gefolgt von Symptomen erhöhten Hirndrucks.

Das EEG zeigt einen Herdbefund. Im MRT erzeugt der Tumor in T1 ein gemischtes Signal, in T2 ist er signalintens und inhomogen.

Der Tumor sollte möglichst vollständig entfernt werden. Die Prognose ist schlecht. Es kann zwar mit postoperativer Bestrahlung die Überlebenszeit verlängert werden, jedoch kommt es immer zum Rezidiv.

1.3.3 Oligodendrogliale Tumoren (Oligodendrogliome Grad II)

Oligodendrogliome infiltrieren pilzförmig den Kortex, gelegentlich auch die Meningen, und neigen zu Kalkeinlagerungen.

Das Oligodendrogliom wird häufig durch epileptische Anfälle symptomatisch. Wegen geringer raumfordernder Wirkung kommt es erst spät zu Hirndruckzeichen. Das Erkrankungsalter liegt bei 25-45 Jahren.

Das EEG zeigt oft eine Herdstörung. Im MRT ist der Tumor in T1-Wichtung iso-, in T2-Wichtung hyperintens und unscharf begrenzt.

Oft ist nur eine Teilresektion des Tumors möglich. Dann kann die Chemotherapie oder Bestrahlung die Rezedivrate senken. Die Prognose ist günstiger als bei Astrozytome gleichen Malignitätsgrades.

1.3.4 Ependymäre Tumoren

Dem ventrikelauskleidenden Neuroepithel (Ependym) entstammen Ependymome (Grad II) und die gutartigen Subependymome (Grad I). Beide kommen im Kindes- und Jugendalter vor und wachsen überwiegend infratentoriell verdrängend.

Aufgrund der ventrikelnahen Lokalisation führen sie häufig zum Verschlusshydrozephalus mit den typischen Symptomen einer intrakraniellen Drucksteigerung.

Im MRT sind die Ependymome in ihrer Beziehung zu den Ventrikeln und zum Hirnstamm nachweisbar. In T1 zeigen sie sich hypo- bis isointens, in T2 signalintens. Bei Ependymomen höherer Malignität, die zur Streuung über die Leptomeningen neigen, finden sich Tumorzellen im Liquor.

Ependymome sind besser abgegrenzt und insofern meist auch besser vollständig entfernbar als Astrozytome und Oligodendrogliome. Ependymome, die nicht vollständig resektabel sind, werden nachbestrahlt, da sie die strahlensensibelsten Gliome sind. Ependymzellen haben nicht die Fähigkeit der Migration. Daher ist ihre Prognose grundsätzlich besser als die der Astrozytome und Oligodendrogliome.

1.3.5 Weitere Tumoren des Nervensystems

Hierzu gehören weitere Neuroepitheliale Tumoren wie die Choroidalplexustumoren, neuronale und gemischt neuronal-gliöse Tumoren, neuroblastische Tumoren, Pinealisparenchymtumoren und die embryonalen Tumoren.

Neben den Neuroepithelialen Tumoren hat die WHO-Klassifikation (3. Auflage, 2005) noch sechs weiter Hauptgruppen gebildet. Diese sind die Tumoren peripherer Nerven, Tumoren der Meningen, Lymphome und hämatopoetische Tumoren, Keimzelltumoren, Tumoren der Sellaregion und metastatische Tumoren.

1.4 Modelle bei Hirntumoren

1.4.1 Grundlagen der Modelltheorie

Mit einem Modell möchte man die in den wissenschaftlichen Theorien vorzufindenden komplexen Zusammenhänge soweit vereinfachen, bis sie der unmittelbaren Überprüfung zugänglich sind. Hierzu sollte ein wissenschaftliches Modell repräsentativ für das zu untersuchende Original sein. Somit muss ein hohes Maß an Gemeinsamkeiten zwischen Modell und dem Original bestehen. Wichtig ist, dass das naturwissenschaftliche Modell sowie das Original im Hauptanliegen des zu untersuchenden Gegenstandes eine hohe Übereinstimmung aufweisen.

Original und das Modell beeinflussen sich gegenseitig. Der Konstruktion eines geeigneten Modells liegen Fakten über das Original zugrunde, das wiederum aus den Modellversuchen weiterführende Ergebnisse und deren Interpretation bezieht.

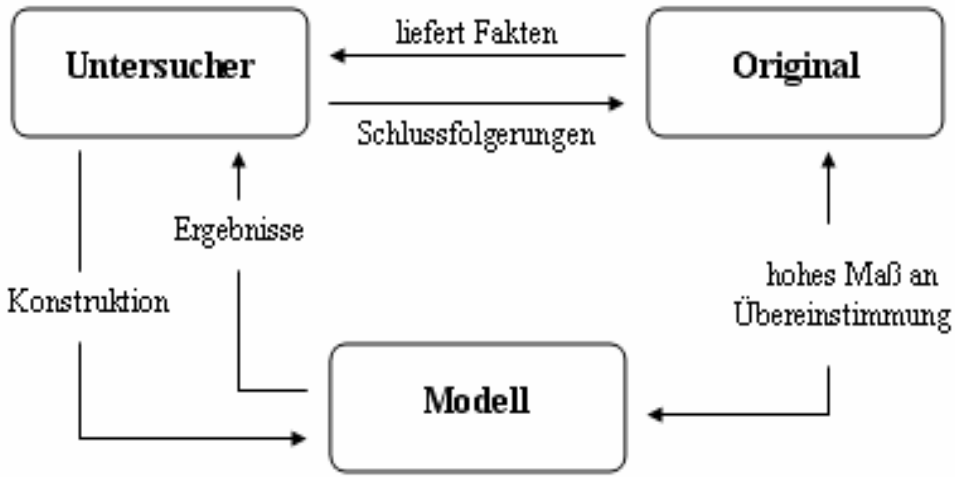


Abb. 1.1 **Original-Modell-Beziehung nach HERRLITZ.**

1.4.2 Die wichtigsten Modelle der experimentellen Erzeugung von Hirntumoren

Die Geburtsstunde der experimentellen Onkologie lässt sich auf das Jahr 1851 datieren. In diesem Jahr pflanzte Joseph Leidy, Philadelphia, vier Fragmente eines menschlichen Brustkrebses unter die Haut eines Frosches, den vier Stunden früher sein Kollege Dr. Horner exstipiert hatte. Dieser Arbeit folgte eine große Anzahl anderer Arbeiten über die experimentelle Übertragung des Krebses. Mit der Zeit erkannte man die Möglichkeit einer Übertragung zwischen Tieren derselben Art, ganz besonders bei der Maus und der Ratte, und dass man so charakteristische Stämme von transplantiertem Krebs auf unbegrenzte Zeit erhalten konnte.

Die Erforschung der Ätiologie und Pathogenese der menschlichen Tumoren des zentralen Nervensystems setzt ebenfalls häufig den Einsatz experimenteller Tiermodelle voraus. Nach ZÜLCH (1986) kann für die experimentelle Neuroonkologie folgendes formuliert werden:

- Entwicklung eines experimentellen Modells mit einer reproduzierbar hohen Rate an Tumorinzidenz.
- Untersuchung der Ätiologie und Pathogenese dieser Modelle unter dem Aspekt der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

Zwar fehlt den Untersuchungen am Tiermodell die Präzision und Eleganz zellbiologischer Untersuchungen, dafür ist es mit ihnen möglich, die gerade bei Hirntumoren komplizierten anatomischen Voraussetzungen zu berücksichtigen.

Im Folgenden soll ein Überblick über die wesentlichen Induktionsmechanismen für experimentelle Hirntumormodelle gegeben werden.

1.4.2.1 Nicht-neurogene intrazerebrale Tumoren

Der wichtigste Vertreter aus dieser Gruppe ist die L1210-Leukämie, die in den späten 40er Jahren an Mäusen induziert wurde (LAW et al., 1949). Die L1210-Leukämie gehört zu den bestuntersuchten experimentellen Tumormodellen.

Im Verlauf der leukämischen Aussaat von L-1210-Zellen kommt es zu einer zerebralen Mitbeteiligung, so dass die L1210-Leukämie ein geeignetes Modell zur Untersuchung intrakranieller Manifestationsformen von hämatologischen Systemerkrankungen darstellt.

Bei der Entwicklung neuer Substanzen für die Hirntumor-Chemotherapie im Rahmen des National Cancer Institute (NCI) Programmes in den 60er Jahren wurde das L1210-Modell als wichtigstes Testsystem für die Neuentwicklung von Zytostatika, aber auch Nitrosoharnstoffderivate, verwendet (SCHABEL, 1976; SCHEPARTZ, 1976).

Der Nachteil dieses Modells ist jedoch der nicht-neurogene Ursprung.

1.4.2.2 Xenotransplantate

Eine Heterotransplantation menschlicher gliöser Tumoren in Tiere ist durch das Immunsytem des Empfängers stark eingeschränkt. Lediglich an immunologisch ausgesparten Orten ist ein Wachstum möglich.

So wurden erfolgreiche Transplantationen in die vordere Augenkammer beschrieben. Einigen Autoren gelang auch die erfolgreiche Heterotransplantation in das vom Immunsystem relativ abgeschirmte Gehirn einiger Spezies (WILSON u. BATES, 1972).

Durch den Einsatz von athymischen Nacktmausmutanten steht nun ein Modell zur Verfügung, mit dem eine Vielzahl von subkutanen und intrazerebralen Transplantationen menschlicher Gliome durchgeführt wurde (BIGNER et al., 1981).

Ein wesentlicher Nachteil dieses Modells ist die Interaktion mit ortsständigem Wirtsgewebe vor allem bei der subkutanen Verimpfung. Darüber hinaus kommt es bei den ausgesprochen heterogenen menschlichen Gliomen zur Selektion einer bestimmten Zellpopulation, so dass das resultierende isomorphe Xenotransplantat nicht mehr mit dem Primärtumor vergleichbar ist (HORTEN et al., 1989).

1.4.2.3 Virusinduktion

Eine durch Viren verursachte Induktion von experimentellen Hirntumoren gelang erstmals VASQUEZ-LOPEZ mit Rous-Sarkoma-Virus an Hühnern (VASQUES-LOPEZ, 1936). Seitdem sind Vieren, sowohl andere RNA-Viren als auch DNA-Viren, vielfach auch bei Säugetieren zur Induktion intrakranieller Geschwülste verwandt worden.

Eine erfolgreiche Induktion gelang in den meisten Fällen aber nur durch direkte intrazerebrale Inokulation der viralen Partikel. Der Grund ist wohl die Bluthirnschranke, die eine bedeutende Barriere für Viren darstellt. Damit ist die experimentelle Applikationsart doch sehr kritisch zu bewerten.

Auch wenn schon seit längerer Zeit die Aktivierung verschiedener Proto-Onkogene in Tumoren nachgewiesen werden konnte, konnten bisher virale Onkogene als Ursache

menschlicher Hirntumoren nicht nachgewiesen werden (ZÜLCH, 1986). Dies gilt auch für DNS-Viren (ANDERSON et al., 1985), siehe auch 1.4.4 .

1.4.2.4 Transgene Mäuse

Durch die Einführung rekombinanter DNS-Techniken in die Neuroonkologie konnte ein weiteres Tiermodell etabliert werden. Hierbei wird ein bekanntes zusätzliches Gen, ein sogenanntes Transgen, in die Keimbahn eingebracht. Obwohl das in einer Vielzahl von Tierarten prinzipiell möglich und bereits gelungen ist, hat bisher nur das Modell der transgenen Mäuse wissenschaftliche Bedeutung erlangt.

Das Gen, dessen Expression im Modell studiert werden soll, wird in den männlichen Vorkern fertilisierter Eizellen mikroinjiziert. Diese Eizellen werden anschließend in pseudograviden Mäuseweibchen implantiert. In durchschnittlich 25% der Nachkommen kann eine Expression des Transgens nachgewiesen werden (ROSENFELD et al., 1988). Das Transgen wird anschließend mit dem normalen Genom entsprechend den Mendelschen Gesetzen weitervererbt.

Für Hirntumore konnten noch kein spezifisches transgenes Modell entwickelt werden. Lediglich zwei Polyoma-Viren sind in diesem Zusammenhang erwähnenswert.

Zum einen das Simian-Virus 40 (SV40) und das Jakob-Creutzfeld-Virus (JC-Virus), welches seit 1997 kein Virus mehr ist. Denn Stanley B. Prusiner (* 1942 USA) beschrieb erstmals die Prionen (infektiöse Partikel), ein neues biologisches Prinzip der Infektion. Der Virus und das infektiöse Partikel sind für die Untersuchung der zellulären Veränderung bei neoplastischer Transformation jedoch ungeeignet. Sie konnten auch nicht als Ursache menschlicher Hirntumoren nachgewiesen werden (GEISSLER u. STANEZEK, 1988).

1.4.2.5 Trauma

Traumen am zentralen und peripheren Nervensystem führten bis jetzt nicht zu echten Tumoren. Eine unterstützende Wirkung der durch das Trauma gesetzten Regeneration für das Tumorwachstum wurde diskutiert, konnte aber bis jetzt ebenfalls nicht nachgewiesen werden (MENNEL et al., 1971).

1.4.2.6 Hormone

Antoine Lacassagne, Paris, war einer der ersten, der einen Zusammenhang zwischen der Verabreichung von weiblichen Hormonen an der Maus und den dadurch entstandenen

Brustdrüsenkrebs sah. Jahre später konnte durch Hormone oder analoge Maßnahmen vor allem Hypophysenadenome bei Mäusen und Ratten induziert werden. Die Induktion von Hypophysentumoren gelingt mit großer Sicherheit, jedoch spielen auch hier genetische Einflüsse eine entscheidende Rolle.

Bei Mäusen war die Anwendung von Östrogenlösung in Chloroform erfolgreich (CRAMER u. HORNING, 1936; HORNING, 1952; GARDENER et al., 1953). Analoge Maßnahmen, wie Kastration hatten bei einigen Mäusestämmen die gleiche Wirkung (DICKIE u. WOLLEY, 1949; DICKIE u. LANE, 1956). Eine hohe Ausbeute wurde auch durch von J^{131} erziehlt (GORBMANN, 1949; GOLDBERG u. CHAIKOFF, 1951; FURTH u. BURNETT, 1951; SILBERBERG u. SILBERBERG, 1954). Erfolgreich waren ebenso Behandlungen mit Thiouracil (MOORE et al., 1953) und Thyreoidektomie (DENT et al., 1955).

Es zeigte sich, dass die Methoden, die bei Mäusen sehr erfolgreich waren, bei Ratten zum größten Teil versagten. Gut wirksam bei Ratten ist nur die Anwendung von Östrogen (ZONDECK, 1936; MC EUEN et al, 1936). Ähnliche Ergebnisse hatten Ovarialtransplantationen (OBERLING et al., 1936, OBERLING et al., 1939) Parabiose mit ovarialektomierten Tieren (BIELSCHOWSKY u. HALL, 1951) und Kastration, wobei dann allerdings auch recht kleine Tumoren entstanden, sogenannte Mikroadenome (HOUSSAY et al., 1955).

Allerdings kommen diese Tumoren bei Ratten (GRIEPENTROG, 1964; SCHULZE, 1960) und Mäusen (GARDENER, STRONG u. SMITH, 1936; FURTH, BUFFETT u. GADSDEN, 1957) auch spontan vor. Untersuchungen zeigten eine etwas geringere Spontanrate bei Mäusen als bei Ratten.

1.4.2.7 Strahlen

Angeregt durch das überdurchschnittliche Auftreten des Hautkrebses bei Röntgenologen gelingt es Jean Clunet 1910 in Paris zum ersten Mal, an der Ratte ein Malignom durch Bestrahlung mit X-Strahlen zu verursachen.

In späteren Tierversuchen wurden allerdings nur Hypophysentumoren als einzige Tumoren des intrakraniellen Raums beschrieben (FURTH et al., 1957). Befunde aus der Humanpathologie legten indes den Verdacht nahe, dass Bestrahlung einen intrakraniellen Tumor verursachen kann. Aus diesem Grund bestrahlte HARDER (1967) Kaninchen und beobachtete danach Astroglianarben, die sich durchaus mit gliösen Tumoren vergleichen ließen.

1.4.2.8 Chemische Substanzen

Den Begriff der karzinogenen Substanz erschuf *Shear* 1938. Man verwendete ihn für Stoffe wie Krotonöl oder Kreosot, die von sich aus zwar nicht karzinogen sind, aber je nach Menge und Applikationszeit die Wirkung echter karzinogener Faktoren wie bestimmter polyzyklischer Kohlenwasserstoffe erleichtern. Die erste erfolgreiche Erzeugung von Tumoren des Nervensystems mit Methylcholanthren (karzinogenes Kohlenwasserstoff) an Mäusen erfolgte durch SELIGMAN und SHEAR (1939). Der Erfolg verursachte eine ganze Reihe von Untersuchungen mit karzinogenen Kohlenwasserstoffen und ähnlichen krebserzeugenden Substanzen.

1956 wurden alkylierende Nitrosamione von MAGEE und BARNES als Karzinogene erkannt. Der Anlaß war das gehäufte Auftreten von Leberkrebsen bei Arbeitern in einer Gummifabrik, in der Nitrosamine als Lösungsmittel verwandt wurden. Als Leberkrebs erzeugendes Agens wurde das Diethyl-Nitrosamin identifiziert. Es zeigte sich im Tierversuch als außerordentlich wirksam und führte ausschließlich bei resorptiver Gabe zu hepatuzellulären Karzinomen.

In der Folgezeit wurde eine ganze Reihe von karzinogenen Nitrosaminen als wirksam identifiziert. Die symmetrisch substituierten Dialkyl-Nitrosamine führten in der Regel zu Leberkrebs, während die asymmetrisch substituierten Dialkyl-Nitrosamine zu Tumoren des Ösophagus oder auch der Harnblase führten.

Klassische Nitrosamine, die enzymatische Aktivierung zum Abbau benötigten, induzierten keine Tumoren im Nervensystem. Dies war erstmals mit spontan hydrolisierenden N-Nitrosoharnstoffen möglich. Die Mustersubstanz dieser Verbindungen war Methylnitrosoharnstoff. Es zeigte sich in Tierversuchen, an erwachsenen Ratten, als treffsicher und reproduzierbar wirksam im ZNS (IVANKOVIC u. DRUCKREY, 1964). Vorausgegangen war die Erzeugung von Nasennebenhöhlentumoren mit zyklischen Nitrosaminen (DRUCKREY et al., 1964). Hier waren die Geschwülste neurogenen Ursprungs in der hinteren Nasenhöhle entstanden.

Echte Hirntumoren, Gliome und periphere Nerventumoren wurden dann mit den genannten Harnstoffderivaten erzeugt. Wirksam waren ebenfalls Ethyl-Nitrosoharnstoffe und mehrfach substituierte N-Nitrosoharnstoffderivate.

Eine weitere Entwicklung zeigte sich durch die Entdeckung der transplazentaren Wirkung verschiedener alkylierender, ebenfalls schnell hydrolisierender Verbindungen der Harnstoffgruppe. Hier war die Mustersubstanz Ethyl-Nitrosoharnstoff. Selbige wurde

auch in dieser Arbeit verwendet, um die beschriebenen Primärtumoren zu erzeugen. Diese Substanz induziert bei den Nachkommen mit nahezu 100 % Wahrscheinlichkeit Tumoren des ZNS, falls sie nach dem 15. Tag der Schwangerschaft bei trächtigen Ratten appliziert wird.

Dieses neue Wirkungsprinzip war in der Folgezeit Gegenstand einer Reihe von Untersuchungen aus der sich ein effektives, reproduzierbares und der Realität entsprechendes Tumormodell entwickelte, welches dieser Arbeit zugrunde liegt (siehe Kap. 1.4.3).

1.4.2.8.1 Topische Applikation

Erfolgreich wurden die Substanzen Methylcholanthren (PEERS, 1940; ZIMMERMAN, 1940; ARNOLD, 1941), Benzpyren (ZIMMERMAN u. ARNOLD, 1943) und Dibenzanthrazen (PEERS, 1939; ARNOLD u. ZIMMERMAN, 1943) bei lokaler Implantation, meist als Pellet, in das Gehirn von Mäusen eingesetzt. Die Tumorausbeute bei Ratten war weniger erfolgreich. Eine Zusammenstellung der erfolglosen Versuche, mit karzinogenen Kohlenwasserstoffe Hirntumoren zu erzeugen, findet sich bei KIRSCH und SCHULZ (1972). Auch ZIMMERMAN (1962 u. 1969) hat die Ergebnisse seiner Arbeitsgruppe zusammenfassend veröffentlicht.

1.4.2.8.2 Resorptive Gabe

Einen neuen Aufschwung erfuhr die experimentelle Hirntumorforschung durch die Entdeckung der krebserzeugenden Wirkung von Dimethylnitrosamin durch MAGEE und BARNES (1956). Die Verwendung von resorptiv wirkenden Karzinogenen, deren ersten hochwirksamen Vertreter die Nitrosamine und Nitrosamide waren, führte in den unterschiedlichsten Organen zu Krebs. Bei der Stoffklasse der Nitrosamine stellte sich dann für die einzelne Verbindungen eine erstaunliche Organotropie heraus (DRUCKREY et al. 1967).

Zu der Gruppe der Nitrosamine, mit denen einige neurogene Tumoren erzeugt werden konnten, traten dann die Nitrosamide mit teilweise spezifischer Wirkung im Nervensystem.

1.4.2.8.2.1 Chronische resorptive Gabe

Sie erfolgte als tägliche Gabe im Trinkwasser, wöchentlich oder in vergleichbaren Abständen intravenös (i.v.), subkutan (s.c.), intraperitoneal (i.p.) oder als intragastrische Gabe über eine Magensonde. Auch andere Applikationsformen wie Inhalation, rektale

und percutan Gabe sind möglich. Bei diesen Formen der Darreichung ist darauf zu achten, dass nur adulte Tiere verwendet werden.

Mit zyklischen Nitrosaminen konnten Tumoren der Nasenhöhle bei Goldhamster (DRUCKREY et al. 1963) und der Ratte (DRUCKREY et al. 1967) induziert werden. Dabei waren die Geschwülste, die in der vorderen Nasenhöhle entstanden waren, als Plattenepithel- bzw. Adenokarzinom zu beschreiben, während die Tumoren im Bereich der hinteren Nasenhöhle neuroektodermale Charakteristika aufwiesen. Sie wurden als Esthesioneuroepitheliome und Medulloepitheliome klassifiziert. MENNEL (1966) induzierte dann regelmäßig mit cyklischen Nitrosaminen solche Tumoren bei Ratten.

Mit Alkyl-Nitrosoharnstoffen wurden außerordentlich stark wirksame, spezifisch neurotrope Substanzen gefunden. DRUCKREY et al. erzeugte 1964 erstmals, durch den Einsatz solcher Substanzen (Methylnitrosoharnstoff), die ersten „echten“ Tumoren des Nervensystems. Nach chronischer i.v. Administration von Methylnitrosoharnstoff (Methylnitrosourea, MNU) traten sie im Gehirn, Rückenmark und peripheren Nervensystem von adulten Ratten auf. Diese Ergebnisse konnten vielfach reproduziert werden. Die Morphologie der Tumoren war gut mit denen vom Menschen vergleichbar.

Der Einsatz von Äthylnitrosoharnstoff (ÄNH) bei chronischer Gabe war, nach Angaben von DRUCKREY et al. (1967), weniger erfolgreich. Es entstanden nur wenige Tumoren des Gehirns und Rückenmarks.

1.4.2.8.2.2 Einmalige Gabe

1.4.2.8.2.3 Am adulten Tier

An ausgewachsenen Tieren wurden verschiedene Substanzen bei einmaliger Gabe getestet. Es trat in hoher Regelmäßigkeit eine breite Streuung der Tumoren in den betroffenen Organen auf. Die Organotropie war weniger stark ausgebildet als bei chronischer Gabe (MENNEL, 1975).

1.4.2.8.2.4 Am neugeborenen und jungen Tier

Hier erwies sich Äthylnitrosoharnstoff als außerordentliche wirksame Substanz, selektiv Geschwülste im Nervensystem zu induzieren (DRUCKREY et al., 1970). Es zeigte sich deutlich eine Abhängigkeit vom Applikationstermin als auch von der applizierten Dosis (Druckrey et al., 1970).

1.4.2.8.2.5 Transplazentare Gabe

Einen weiteren Fortschritt erfuhr das Tumormodell aus der Erkenntnis, dass einige der eingesetzten Substanzen auch transplazentar wirken. Die Mustersubstanz für diese Art der Verabreichung ist ÄNH. Es ist bei ähnlicher karzinogener Wirkung an adulten Ratten, weitaus weniger toxisch als MNH. Mehr zur Substanz ÄNH in Kapitel 2.1.3.1 . Als Versuchstiere dienten BD-Ratten (DRUCKREY, 1960 u. 1971), da maligne Tumoren bei ihnen spontan fast nicht vorkommen (< 0,1%).

Dieses Modell wurde auch für diese Arbeit verwendet. Es soll daher auf wesentliche Aspekte des Modells eingegangen werden.

Frühere Versuche an Ratten (IVANKOVIC, 1966; DRUCKREY et al., 1966; IVANKOVIC, 1968; IVANKOVIC u. DRUCKREY, 1968) hatten gezeigt, dass die Behandlung schwangerer Ratten mit ÄNH in der zweiten Hälfte der Gestation bei praktisch allen Nachkommen Malignome, vorwiegend im Nervensystem zur Folge hatte. Eine karzinogene Wirkung trat bei einer Behandlung vor dem 11. Tag der Schwangerschaft, nicht ein. Die karzinogene Wirkung ist also in ähnlicher Weise von dem Entwicklungsstand des Fetus abhängig wie die teratogene Wirkung (IVANKOVIC u. DRUCKREY, 1968).

Durch die transplazentare Induktion der Hirntumoren kommt es zu keiner direkten Applikation der Substanz in das Nervengewebe. Somit können „endogene“ Verhältnisse simuliert werden. Ein weiterer Vorteil dieses Modells gegenüber den anderen ist eine hohe Tumorausbeute bei geringem Aufwand einer nur einmaligen Gabe des Karzinogens (MENNEL, 1982).

MENNEL (1980) zeigt, dass die in diesem Modell erzeugten experimentellen Hirngeschwülste auch morphologisch für die Verhältnisse der humanen Neuropathologie repräsentativ sind. Seit der Verwendung des Modells ist eine große Anzahl der induzierten Geschwülste histologisch bearbeitet worden. Eine sehr gute Übersicht bietet MENNEL (1988).

Tumoren entstehen bei dieser Methode im zentralen und peripheren Nervensystem. Bei letzteren handelte es sich um Malignome an peripheren Nerven. Diese sind wenig differenzierte und zellreiche Neurinome (IVANKOVIC, 1975) die vorwiegend von den Nervenwurzeln ausgehen.

Im Zentralen Nervensystem treten Tumore an den Hirnnerven und im Gehirn selbst auf. Von den bestehenden Hirnnerven war nach IVANKOVIC (1975) vorwiegend der N. trigeminus und das Ganglion Gasseri betroffen. Der zystische Aufbau, der auch bei klei-

nen Trigeminustumoren beobachtet wurde, ist charakteristisch. Es traten auch an anderen Hirnnerven Tumoren auf, jedoch in geringerer Zahl.

Die Tumoren des Gehirns sind Mischgliome und Ependyome. In ihrer Architektur und geweblichen Differenzierung können sie mit menschlichen Hirntumoren verglichen werden (MENNEl, 1982). Die größte Gruppe der in der menschlichen Neuroonkologie auftretenden Tumoren des ZNS sind die Gliome. Für alle Malignitätsgrade menschlicher Gliome findet sich bei diesem Modell bzw. seinen induzierten Tumoren morphologisch repräsentative Malignome.

Die Vorzugslokalisation der Primärtumoren ist in der Umgebung des Ventrikelsystems. Es wird eine Ableitung von den Zellen der subependymären Matrix postuliert. Die Frühformen der Tumoren erinnern in ihrer Morphologie ganz überwiegend an Oligodendrogliome. Als Ursprungszelle wird eine gliöse Zelle mit oligodendrogliöser Differenzierung angenommen (MENNEL, 1988).

Das Auftreten von Ependyomen wird als besondere Differenzierung eines primär gliösen Tumors gewertet. Die Umdifferenzierung der Tumoren während der ersten Transplantationspassage hat zu der Vermutung geführt, dass es sich um primitive neuroektodermale Tumoren handelt (RUBINSTEIN, 1985). Diese Tumoren müssten dann in der Lage sein, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Ein Beispiel aus der Human- Neuroonkologie sind die Medulloblastome (EHRET et al., 1987).

Gegen diese These spricht wohl die Tatsache, dass nie neuronale Differenzierungen in den Tumoren gefunden wurden. Es ist daher eher anzunehmen, dass es sich um niederdifferenzierte gliöse Tumoren handelt. Sie sind dann mit dem menschlichen Gliom gut vergleichbar (MENNEL, 1988).

Die molekularen Mechanismen der Neuaktivierung durch alkylierende Harnstoffderivate sind ebenfalls gut untersucht (WIESTLER et al., 1984; LINDAHL u. SEDGWICK, 1988). Die Zusammenhänge zwischen den molekularen Veränderungen und ihren pathophysiologischen Auswirkungen auf die Zellbiologie konnten weitgehend aufgeklärt werden (SCHECHTER et al, 1984; ZARBEL et al., 1985). Für den Mechanismus der Tumorinduktion besteht eine gute Vergleichbarkeit des Modells mit der humanen Onkologie.

1.4.3 Verschiedene Experimental-Modelle zur Untersuchung von Hirntumoren

Autochthon erzeugte Tumoren des Zentralen Nervensystems besaßen eine lange Induktionszeit und streuten bezüglich ihrer Diagnose erheblich.

Für Versuche, bei denen jedoch vom Ausgangspunkt bis zum entstandenen Tumor eine Reproduzierbarkeit gewährleistet sein muss, sind die autochthonen Hirntumormodelle nicht geeignet. Hierzu müssen abgeleitete Modelle verwendet werden.

Es wurden in der Vergangenheit verschiedene abgeleitete Modelle vorgestellt. Es bieten sich besonders an, das Modell der Transplantationstumoren (MENNEL, 1978) sowie in-vitro explantierter Zellinien und Klone (MENNEL, 1980).

Eine Übersicht über die abgeleiteten Modelle und Applikationsformen gibt Tabelle 1.3.

Modell	Technik	Wachstumsperiode	Untersuchungsziel
Primärtumoren	Wiederholte oder Einzelgabe von alkylierenden Karzinogenen transplazentar, bei jungen oder erwachsenen Tieren	6 Monate bis 3 Jahre	Wirkung der Karzinogenese, Histologie der Tumoren
Transplantationstumoren	Intrazerebral oder subkutane Verimpfung von Organkulturen in-vivo	3 Wochen bis 9 Monate	Wachstumsbeeinflussung, -beobachtung, Histogenese
In-vitro Zellinien Organkulturen	Explantate in-vitro auch Kunststoffschwämmchen= Organkulturen in-vitro	1 Woche bis 3 Monate	Zyto- und Histogenese, zellulärtes Wachstum und dessen Beeinflissung
Kurzzeit-Mono-Layer-Explantate	Von Gewebsstückchen und trypsiniertem Gewebe	1 Woche bis 4 Wochen	Zytogenese
Permanente Klone und Zellinien	Wiederholte Zellkultur und Einzelklonierung	1 Woche	Zytogense, Zellwachstum und dessen Beeinflussung

Tabelle 1. 3 Modelle zur Untersuchung von Hirntumoren

1.4.3.1 Transplantationstumorlinie

Die Transplantationstumoren spielen schon seit langem in der experimentellen Neuroonkologie, wie auch in der allgemeinen Krebsforschung als standardisierte Tumormodelle für verschiedene Aufgaben eine wichtige Rolle.

Bei den Hirntumoren wurden sowohl die Transplantation menschlichen Tumorgewebes als auch das durch Induktion in Tierhirnen gewonnene Tumorgewebe ins Gehirn oder andere biologisch privilegierte Regionen bei Labortieren versucht. Solche Regionen sind besonders die vordere Augenkammer oder die Backentasche des Hamsters. Die Arbeitsgruppe um ZIMMERMAN verimpfte in der Folgezeit durch karzinogene Kohlenwasserstoffe induzierte Tumoren auf Mäuse (ZIMMERMAN u. ARNOLD, 1941/1943).

Als Standardtumor wurde das sogenannte Mäuseependymblastom vielfach gehalten und ausgedehnt untersucht (ZIMMERMAN u. MAIER, 1949)

Mit Nitrosoharnstoff erzeugte Hirntumoren bei Ratten wurden ebenfalls mehrfach transplantiert und untersucht. Peripher aber auch zentral lokalisiert Transplantationstumoren wurden im Arbeitskreis von ZÜLCH seit 1970 regelmäßig gezüchtet.

Eine übersichtliche Darstellung über die älteren Transplantationsversuche menschlicher Geschwülste auf Versuchstiere und die Ergebnisse mit karzinogenen Kohlenwasserstoffen findet sich bei WILSON und BATES (1972).

Die systematischen Transplantationsversuche von mit Nitrosoharnstoff erzeugten peripheren und zentralen Nerventumoren auf BD-IX-Ratten wurden zusammenfassend dargestellt bei MENNEL (1978, 1979).

Damit war für die zentralen nervösen Tumoren ein standardisiertes Modell der Untersuchung geschaffen. Dieses Tumormodell liegt dieser Doktorarbeit zugrunde.

1.4.4 Ein neues Modell zur Wachstumskontrolle

Im laufe der Zeit können bzw. müssen, durch wissenschaftliche Neuentdeckungen, Original-Modell-Beziehungen (Kap. 1.4.1) erweitert werden.

Mit der Entwicklung von Computer gestützten bildgebenden Verfahren, wie der MRT wurde es möglich, Wachstumsverläufe von intrazerebral wachsenden Tumoren im Ganzen zu verfolgen und zu beurteilen.

Die bis dahin verwendete morphologische Untersuchung konnte immer nur ein gewähltes Stadium des Wachstumsverlaufs aufzeigen. In-vivo Wachstumsbeobachtungen waren nicht möglich.

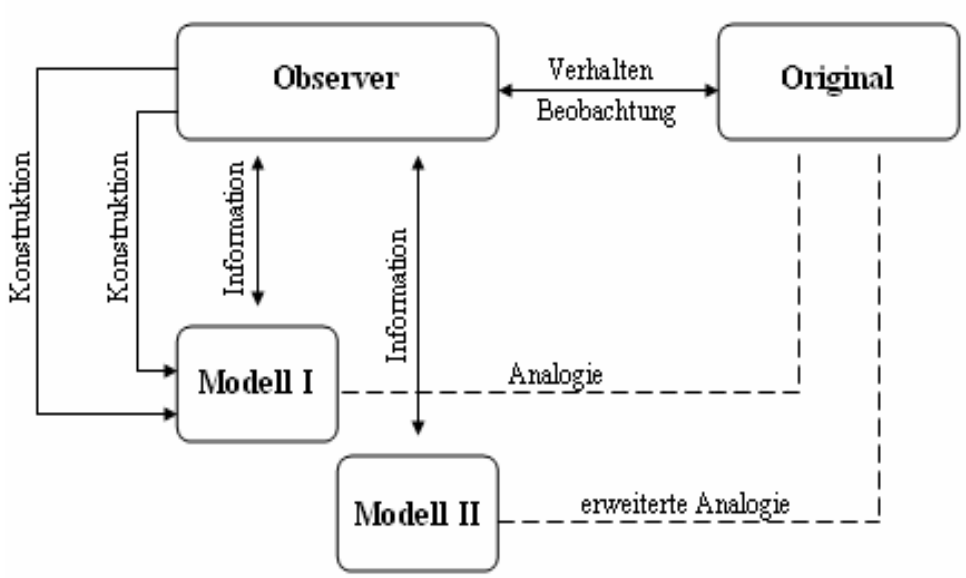


Abb. 1.2 **Erweiterte Original-Modell-Beziehung nach STACHOWIAK.**

Mit Hilfe einer neuen Methode der Bildberechnung (Wasserscheidentransformation = WT) scheint es nun möglich, den in-vivo beobachteten Wachstumsverlauf effizient quantitativ und qualitativ beurteilen zu können.

Anhand des sehr erfolgreichen Modells der Transplantationstumoren wird die Methode der WT, in der vorliegenden Arbeit, geprüft. Sollte sich die Methode gegenüber der lichtmikroskopischen Morphometrie erfolgreich durchsetzen hätte man ein Modell zu Verfügung an dem man Wachstumsverläufe dann unter normalen und therapeutisch modifizierten Bedingungen direkt verfolgen könnte.

1.5 Magnetresonanztomographie

1.5.1 Historische Entwicklung

Die Magnetresonanztomographie (MRT) wird auch heute noch mit den veralteten Synonymen Kernspinresonanztomographie bzw. Kernspintomographie (KST) oder Nuclear magnetic resonance (engl. NMR) bezeichnet. Im englischen Sprachgebrauch hat sich der Begriff magnetic resonance imaging (MRI) durchgesetzt. Die MRT wird als bildgebende Methode seit Anfang der der 80er-Jahre zunehmend in der Diagnostik eingesetzt. Im Unterschied zur CT kommen keine Röntgenstrahlen, sondern ein starkes Magnetfeld und Hochfrequenzimpulse (Radiowellen) zur Anwendung. Auf Grund der völlig anderen Bilderzeugungsverfahren können Gewebekontraste besser dargestellt werden. Bis auf die Lunge werden heute routinemäßig alle Körperregionen mittels MRT untersucht.

Zunehmend gewinnt die MRT bei der funktionellen Bildgebung, insbesondere am Gehirn (fMRI), einen besonderen Stellenwert.

Den physikalischen Grundstein für die heutige MRT legte PAULI 1923. Er entwickelte die Vorstellung, dass viele Atomkerne ein Drehmoment (Spin = Eigenrotation eines Teilchens) und ein magnetisches Moment aufweisen. Aber erst 1946 wurde, unabhängig voneinander, durch BLOCH und PURCELL die nuklearmagnetische Resonanzabsorption in festen Körpern gemessen, die das Vorhandensein von nuklearen Spins klar definierte.

Die Einsatzmöglichkeit für die diagnostische Bildgebung in der Medizin blieb lange Zeit unerkannt. Erst 1973 wurden die ersten MRT-Bilder von LAUTERBURG erzeugt. Das Verfahren etablierte sich 1976 nach den ersten Berichten über bildgebende Aufnahmen am lebenden Menschen von Sir Peter MANSFIELD.

Unterstützt durch die Computertechnologie, nimmt die Entwicklung der MRT-Geräte einen derart rasanten Verlauf, dass zurzeit ca. alle 3-5 Jahre die im Gebrauch befindlichen Geräte überholt werden.

Zwar ist die CT in ihrer Bildauflösung immer noch überlegen, doch ist die MRT das wissenschaftliche Verfahren mit längst nicht ausgeschöpften Möglichkeiten für Morphologie und Funktion.

1.5.2 Physikalische Grundphänomene der MRT

Die im Folgenden aufgelisteten vier Phänomene stellen die physikalische Voraussetzung für die MRT dar.

1. Magnetisches Dipolmoment durch Spin der Atomkerne
2. Präzession, Präzessionsfrequenz und Larmorgleichung
3. Hochfrequenzimpuls, Resonanz und Gesamtmagnetisierungsvektor
4. Relaxation und emittiertes Hochfrequenzsignal

Ein genaues Eingehen auf diese Grundphänomene würde den Rahmen diese Arbeit sprengen. Ich möchte jedoch auf sehr gute Literatur verweisen, die anhand anschaulicher Zeichnungen die Grundlagen sicher vermittelt (CHEN, 1989; SCHILD, 1997; SCHLEGEL, 2002).

1.5.3 Indikationen für die MRT bei Hirntumoren

Auch, wenn mit Hilfe der Computertomogragphie (CT) ein hoher Prozentsatz der Hirntumoren diagnostiziert werden kann, so ist sie dennoch der MRT in einigen Bereichen

unterlegen. Die CT liefert vorwiegend axiale Schnitte und kennt nennenswerte Begrenzungen, wenn es um die Untersuchung der Strukturen der hinteren Schädelgrube geht.

Die MRT, die eine Bilderzeugung in allen Raumebene erlaubt, ist eine deutlich empfindlichere Technik als die CT und liefert somit Bilder von einer ausgezeichneten anatomischen Qualität. Knochenartefakte kommen nicht vor, und insbesondere die hintere Schädelgrube wird durch die MRT vollkommen dargestellt. Die Empfindlichkeit der Flusstechnik erlaubt eine direkte Darstellung der Gefäße, ohne dass auf ein Kontrastmittel zurückgegriffen werden muss, wie dies bei der CT der Fall ist. Auch ist der Nutzen eines anfärbenden, dichtesteigernden Kontrastmittels (Gadolinium) für die MRT heutzutage gut belegt, vor allem bei tumoralen Affektionen.

Abschließend ist darauf hinzuweisen, dass CT und MRT heutzutage als sich ergänzende Techniken anzusehen sind. Der noch begrenzte Zugang zur MRT rechtfertigt, dass sie vorwiegend für die Untersuchung von computertomographisch schlecht sichtbaren Tumoren angewandt wird (Tumoren der hinteren Schädelgrube, an knöcherne Strukturen angrenzende Tumoren wie Meningeome, oder Tumoren, die computertomographisch kein Kontrastmittel anreichern, wie z. B. gewisse benigne Gliome).

Dennoch scheint die Technik der MRT aufgrund ihrer deutlich höheren Empfindlichkeit als die optimale Technik für die Untersuchung von Hirntumoren. Die MRT ergibt jedoch keine spezifischeren diagnostischen Elemente als die CT.

1.6 Watershed Transform

Seit Anfang der 90er Jahre erschienen eine Vielzahl an Arbeiten über die sogenannte Wasserscheidentransformation (Abk. WT, engl. „watershed transform“). DIGABEL und LANTUEJOU waren die ersten, die 1978 über die WT, als eine neue Methode der Bildberechnung berichteten.

Die Idee ist, ein Bild als eine Landschaft zu interpretieren und diese dann durch simulierten Regenfall oder Flutung unter Wasser zu setzen, um dann, mit Hilfe der entstandenen und berechneten Auffangbecken und Wasserscheiden eine topographische Interpretation des Bildes zu erlangen (SOILLE, 2003).

Einen Durchbruch bei der Berechnung solcher Wassergradientenbilder gelang Vincent und Soille in 1991. Sie entwickelten einen effektiveren Algorithmus, mit dessen Hilfe die Bilder schneller und genauer zu berechnen sind. Ihr TPAMI Paper ist eines der meist zitierten Arbeiten unter den WT Publikationen.

1.7 Ziel der Arbeit

Das bereits beschriebene Hirntumortransplantationsmodell eignet sich neben anderen Untersuchungen auch zur Anwendung von speziell entwickelter Software, mit der es möglich ist, dass durch MRT dokumentierte Tumorwachstum volumetrisch zu quantifizieren.

1. An diesem Ratten-Gliom-Modell soll in der vorliegenden Arbeit die Durchführbarkeit der In-vivo-Tumorwachstumsbeobachtung bei BD-IX Ratten in einem Ganzkörper-Kernspintomographen geprüft werden.
2. Untersuchung der Effektivität der In-vivo-Vermessung der erzeugten Tumoren mit Hilfe einer neuen Methode der Bildbearbeitung zur Grundlagenbildung eventuell nachfolgender Untersuchungen wie, Kontrolle der Wachstumsdynamik der intracerebral wachsenden Tumoren mit und ohne Manipulation des Wachstums.
3. Zum anderen stellt sich die Aufgabe, dieses Modell erneut hinsichtlich seiner Repräsentanz für die Verhältnisse der menschlichen Neuroonkologie zu untersuchen.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

BD IX Ratten (DRUCKREY 1971) stammen ursprünglich von der wildlebenden Spezies rattus norwegicus (Wanderratte) ab und werden seit mehreren Jahrzehnten durch strenge Bruder-Schwesterverpaarung ingezüchtet und gelten als einheitliche Population (DRUCKREY et al., 1962). Der Stamm erwies sich auch in Histokompatibilitätsuntersuchungen als einheitlich und bei Hauttransplantationsversuchen zwischen verschiedenen Tieren innerhalb desselben Stammes als tolerant (DRUCKREY 1971). Es zeigte sich auch, dass dieser Stamm besonders für neuropathologische Tierversuche geeignet ist (DRUCKREY et al., 1962). Die durchschnittliche Lebenserwartung dieser Tiere beträgt zwischen 700 und 950 Tagen (DRUCKREY et al., 1962). Wir erhielten die ersten Tiere aus der Zucht des ehemaligen Instituts für Präventivmedizin am Max-Planck-Institut für Immunologie in Freiburg.

Für termingerechte Verpaarung wurden je zwei Weibchen und ein Männchen über Nacht in einem Käfig gehalten. Die erfolgreiche Verpaarung wurde durch einen Vaginalabstrich festgestellt. Jungtiere blieben bis zum Alter von ca. 5 Wochen bei den Eltern und wurden anschließend nach Geschlecht getrennt. Die Tragzeit dieser Ratten beträgt ca. 23 Tage mit einer durchschnittlichen Wurfgröße von 8 Nachkommen.

Die Tiere kamen meist im Alter von etwa 10 Wochen in die Versuche. Es wurden etwa zu gleichen Anteilen männliche wie weibliche Tiere verwendet.

Sie erhielten als Futter die Standardversuchstierdiät Altromin® (BROCK u. WILK, 1961) sowie frisches Leitungswasser ad libitum. Jedes Versuchstier wurde mit einer Ohrmarke eindeutig gekennzeichnet.

2.1.2 Tumorzelllinie

Für die Untersuchungen wurde die Transplantationstumorlinie G-XIX verwendet. Diese Linie leitet sich von einem spinalen Mischgliom ab, das an Ratten des Inzuchtstammes BD-IX durch die Gabe von Ethylnitrosoharnstoff (NEU) transplazentar induziert wurde (DRUCKREY et al., 1970). Näheres zur Induktion des Transplantationstumors unter 2.2.1

.

Die primäre Induktionszeit betrug 60 Tage, der entstandene Tumor zeigte in Biologie und Morphologie ein buntes Bild (MENNEL, 1988). Die Standardisierung des Tumors erfolgte durch intrazerebrale Tier zu Tierpassage.

2.1.3 Substanzen

Die Erzeugung der Transplantationstumore durch einmalige transplazentare Gabe, erfolgte mit Äthyl-nitroso-harnstoff (ÄNH). Diese Substanz wurde erstmals von Druckrey und Mitarbeitern als stark wirksames Karzinogen beschrieben und systematischen Untersuchungen bezüglich Pharmakokinetik und Organotropie in zahlreichen Versuchen insbesondere an Ratten unterzogen (DRUCKREY et al., 1967, 1970).

Durch Versuche an schwangeren Ratten konnte eine transplazentare Karzinogenese mit hoher Tumorrate bei den Nachkommen regelmäßig nachgewiesen werden (IVANKOVIC u. DRUCKREY, 1968; DRUCKREY et al., 1970). Es zeigte sich, dass selbst nach einer Gabe von nur 5 mg/kg (2 % der LD_{50}) eine Tumorausbeute von 63 Prozent beobachtet werden konnte. Bei erwachsenen Ratten waren dagegen 20mg/kg für die gleiche Wirkung erforderlich. Die Empfindlichkeit des Nervensystems während der pränatalen Entwicklung ist daher etwa 50 fach größer (IVANCOVIC u. DRUCKREY, 1968).

Da ÄNH in Wasser nur schlecht löslich ist (bei z.B. 20°C nur zu 1,3 %) wurde die Substanz vor der Verabreichung in Dimethylsulfoxid (DMSO), einem dipolaren aprotischen Lösungsmittel geringer Toxizität, gelöst. Auch ist zu beachten, dass ÄNH in neutralem und alkalischem Milieu rasch heterolytisch gespalten wird. Die Halbwertszeit beträgt bei pH 6, 31 Sunden und bei pH 7, 1,5 Stunden (DRUCKREY et al., 1967).

Als wesentlicher Wirkungsmechanismus wird neben der Carbamoilation durch freigesetzte Isozyanate die Alkylierung von molekularen Zellbestandteilen angesehen (WHEELER, 1975). Durch spontane Hydrolyse der Acylalkylnitrosoamide in vivo entsteht über die hochreaktiven kurzlebigen Zwischenprodukte Monoalkylnitrosamin und dem Alkyldiazoniumion die eigentliche Wirkform das positiv geladene Carbenium-Ion (DRUCKREY et al., 1967).

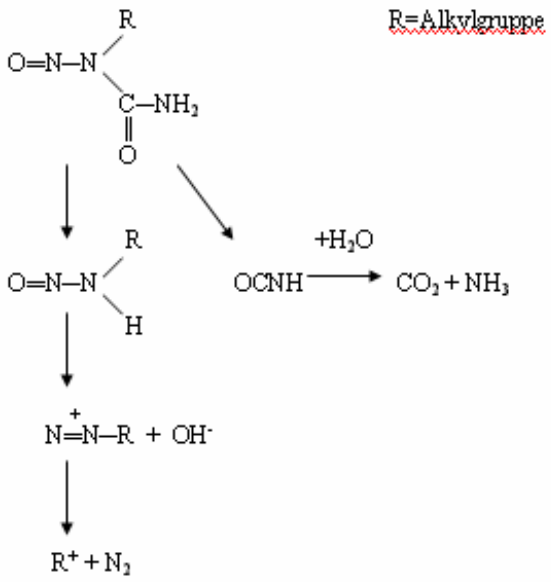


Abb. 2.1

Das hochreaktive elektrophile Alkyl-Kation reagiert bevorzugt mit nukleophilen Substanzen und insbesondere mit nukleophilen Gruppen biologischer Makromoleküle, indem es stabile kovalente Bindungen im Sinne einer nukleophilen Substitution erster Ordnung (S_N1-Reaktion) mit ihnen bildet (PRICE, 1975; WHEELER, 1975). Da viele molekulare Zellbestandteile nukleophile Zentren wie Phosphat-, Amino-, Sulfhydryl-, Carboxyl- und Imidazol-Gruppen besitzen, gibt es mannigfach Möglichkeiten für diese Alkylantien, den Zellstoffwechsel zu beeinflussen (CLARYSSE et al., 1976).

So konnte gezeigt werden, dass Methylierung und Äthylierung an folgenden Stellen der Nucleinsäurebasen stattfinden:

- Adenin: N-1, N-3 und N-7
- Cytosin: N-3
- Guanin: N-3, N-7 und 0-6
- Thymin: 0-4

(KLEIHUES et al., 1976).

2.1.3.1 ÄNH

Chemische Bezeichnung:

- Acyl-alkylnitrosamid N-nitroso-N-äthylharnstoff

Chemische Eigenschaften:

- Summenformel: $C_3H_7N_3O_2$

- Molekulargewicht: 117,1
- Lipidlöslichkeit:
- Schmelzpunkt: 103°C-104°C

Strukturformel:

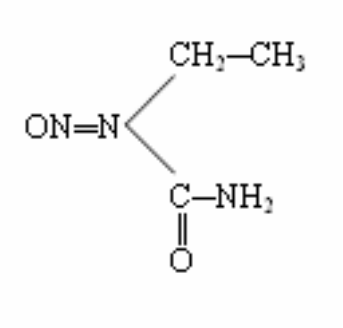


Abb. 2.2

2.1.3.2 DMSO

Chemische Bezeichnung:

- Dimethylsulfoxid

Chemische Eigenschaften:

- Summenformel: C_2H_6OS
- Molekulargewicht: 78,1
- Schmelzpunkt: 18,45 °C
- Siedepunkt: 83°C
- Flammpunkt: 95°C

Strukturformel:

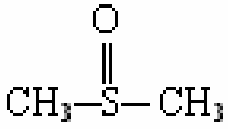


Abb. 2.3

2.1.4 Technische Ausrüstung

Für die Trepanation des Rattenschädels wurde ein Handbohrer der Firma Kavo, mit K4 Handstück 4914 und dem K4 Tisch-Steuergerät 4954, ebenfalls Kavo, verwendet

(Abb.2. 4. a). Dieses Gerät ist über ein Fußpedal steuerbar und in den Umdrehungen stufenlos, zwischen 1000-30.000 U/min, einzustellen.

Zur seriellen Verimpfung wurden die Ratten auf einen stereotaktischen Tisch der Firma UHL Technische Mikroskope, Feinmechanik, eingespannt (Abb.2. 4. b).

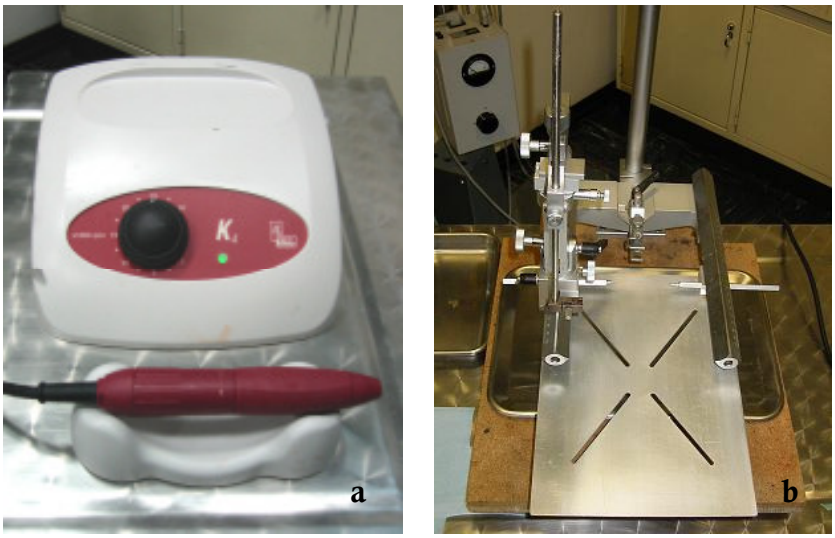


Abb. 2.4 (a) Handbohrer und **(b)** stereotaktischer Tisch.

Die MRT-Aufnahmen wurden mit einem 1.0 clinical scanner Magnetom Expert™ der Firma Siemens, Erlangen, und mehreren selbstgebauten linear polarisierten Volumenspulen durchgeführt. Diese Spulen wurden extra für Kleintieraufnahmen konzipiert, da ein klinischer Ganzkörper MR-Scanner nur mittels geeigneter Hardwaremodifikationen in der Lage ist, kleine Volumina, wie z.B. Ratten oder Mäuse, in hoher Bildqualität zu erfassen. Deshalb wurden für dieses Forschungsvorhaben spezielle, dezidierte Kleintierempfangsspulen entwickelt und implementiert.

Um Schnittbilder eines Rattenhirns mit hoher diagnostischer Aussagekraft bei gutem Bildkontrast und guter Bildschärfe zu akquirieren, wurde eine modifizierte, linearpolarisierte Sattelspule mit einer Länge von 10 Zentimeter und einer Diametergröße von 4,2 Zentimeter entwickelt (siehe Abb. 2. 5. a u. b).

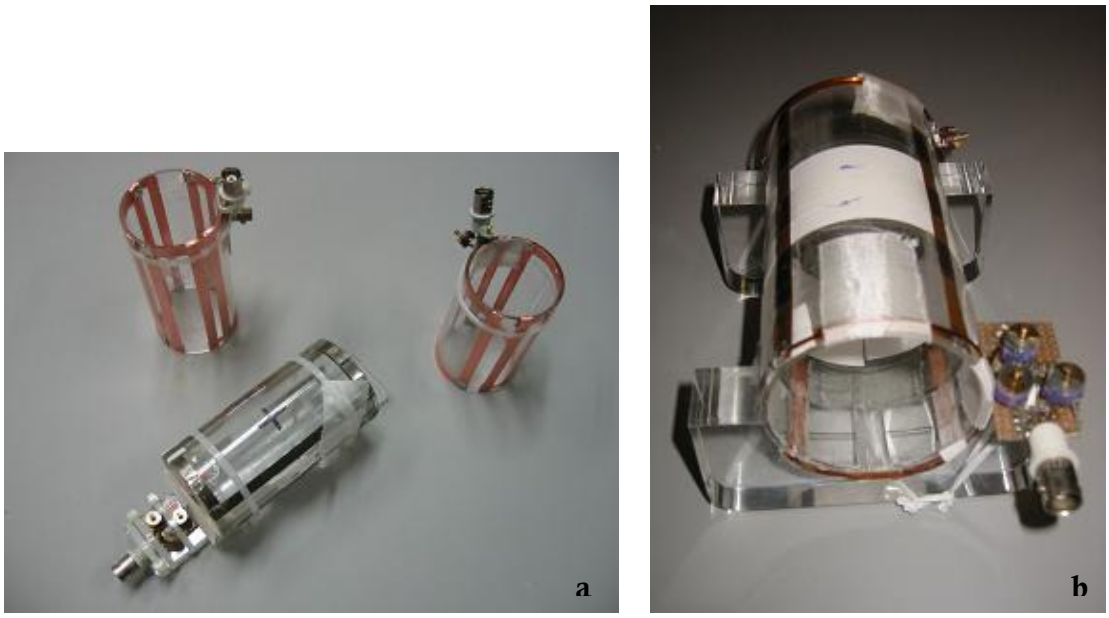


Abb. 2.5 (a) und **(b)**: Eigens für Kleintiere konzipierte Sattelspulen.

Mit dieser Spule konnte das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der akquirierten Schnittbilder enorm gesteigert werden, und das Rattenhirn mit einem isotropen Auflösungsvermögen von bis zu 300 Mikrometer visualisiert werden. Die Bildgebung wurde mittels T1- und T2 gewichteten 3D Echo Sequenzen durchgeführt.

Bei der seriellen Verimpfung der einzelnen Tumoren wurde ein Magnetrührer IKA-Combimag RCO der Firma Janke & Kunkel GmbH & co. KG., eine Zentrifuge Labofuge 1 der Firma Heraeus Christ, und ein Mikroskop der Firma Zeiss, Germany mit einem Kamerasystem ebenfalls von der Firma Zeiss, Germany verwendet. Die Gewichtskontrolle der Versuchstiere wurde mit einer portablen, elektronischen Waage der Firma Sartorius, durchgeführt.

2.1.5 Medikamente

Für die Anästhesie wurde benutzt:

- Ketavet® 50 mg/ml oder 100 mg/ml, Pharmacia GmbH, mit dem Wirkstoff Ketaminhydrochlorid, für Tiere. Ketavet® ist ein Allgemein-Anästhetikum, welches intramuskulär, subkutan und/oder intravenös injiziert wird. Es ist ein Anästhetikum mit hypnotischen Eigenschaften, raschem Wirkungseintritt und stammt nicht aus der Barbiturat-Reihe. Die klinische Hauptwirkung besteht in einer schnell eintretenden, starken Analgesie der Körperhülle. Die Analgesie geht ei-

ner ebenfalls eintretenden, mäßig tiefen Hypnose voraus und überdauert dieselbe (dissoziierte Anästhesie).

- Rompun 2%, Bayer Vital GmbH mit dem Wirkstoff Xylazinhydrochlorid, für Tiere. Rompun hat eine sedative, analgetische, anästhetische und muskelrelaxierende Wirkung. Es bewirkt einen schlafähnlichen (sedativ-hypnotisch) Zustand, der mit einer allgemeinen Muskelrelaxion und einer von Tierart zu Tierart und individuell unterschiedlich ausgeprägten Schmerzfreiheit verbunden ist.

Die Gabe von Ketavet® und Rompun geschah abhängig nach Körpergewicht und Dosiertabelle (siehe Anhang).

2.1.6 Lösungen

Die Aufnahme des Tumors bei der seriellen Verimpfung geschah in einem Aliquot Nährmedium, Dulbecco`s MEM der Firma Invitrogen Corporation. Das Nährmedium enthielt Penicillin 1% und Streptomycin 1% von der Firma Seromed, Germany. Trypsin 0.25 % ohne EDTA der Firma Invitrogen Corporation, UK wurde zur Gewinnung der Einzelzellsuspension verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Primärinduktion des Transplantationstumors

Jeweils ein männliches und ein weibliches Tier wurden zusammen in einen Käfig gebracht. Bis zum positiven Befund wurden jeden Morgen Vaginalabstriche angefertigt und mikroskopisch auf Spermien untersucht. Der Tag des positiven Ergebnisses galt als 1. Tag post coitum auch p.c. abgekürzt.

Am 15. Tag p.c. wurde dem trächtigen Tier, unter Äthernarkose, Äthylnitrosoharnstoff intraperitoneal injiziert. Die einmalige Dosierung betrug 50 mg/kg Körpergewicht und wurde in Dymethylsulfoxid gelöst appliziert.

Die bei ÄNH nachgewiesene teratogene Wirkung (DRUCKREY et al., 1966) tritt bei Applikation am 15. Tag p.c. nur bei Dosen zwischen 80 und 40mg/kg Körpergewicht auf. Die akute LD_{50} des Muttertiers beträgt 250 mg/kg entsprechend 2 mmol/kg unabhängig von der Applikationsart und dem Zeitpunkt der Applikation in der Schwangerschaft (DRUCKREY et al., 1967). Wo hingegen eine teratogene Wirkung bei Injektion vor dem 12. Tag p.c. nicht eintritt (IVANCOCIC u. DRUCKREY, 1968).

Bei der transplazentaren Karzinogenese nimmt die Selektivität bezüglich der Induktion von Tumoren des Nervensystems im Vergleich zu Versuchen an erwachsenen Tieren deutlich zu (WECHSLER, 1972).

2.2.2 Serielle Verimpfung

Die tumortragenden Tiere wurden bei dem Auftreten von neurologischen Symptomen, wie Gleichgewichtsstörungen und schweren Ausfallserscheinungen, z.B. Paresen, oder allgemein klinischer Symptome, wie struppiges Fell, Apathie oder Kachexie, getötet.

Damit die Hirne strukturerhaltend entfernt werden konnten, wurden die betroffenen Tiere mit der Bauchseite nach unten auf eine Korkplatte fixiert. Die gesamte Kopfhaut wurde mit einer Schere und Pinzette entfernt. Mit einer Knochenzange wurde die Schnauze abgetrennt, damit anschließend an dieser Wunde ansetzend die beiden Scheitelbeine in der Mitte gespalten werden konnten. Mit einer starken Pinzette ließen sich dann die beiden Parietalschuppen relativ leicht auseinander ziehen und das Gehirn oberflächlich freilegen. Nach Entfernung der beiden Ossa temporalia, Durchtrennung der Hirnnerven und des Rückenmarks, wobei ein ca. 1 cm langes Stück des Rückenmarks am Hirn belassen wurde, konnte das Hirn mit einem sterilen Löffel entnommen und in eine Gewebekulturschale mit steriler Nährlösung gegeben werden. Das frisch entnommene Hirn wurde in der Petrischale mit steriler Nährlösung gründlich gewaschen und anschließend makroskopisch untersucht.

Die Festlegung der Tumorlokalisation war mit Hilfe der MRT Aufnahmen und der Tatsache, dass alle Verimpfungen an der rechten Hirnhemisphäre stattfanden, kein Problem.

Im Labor wurden die entnommenen Tumore mit einer Rasierklinge von frontal beginnend geschnitten so dass mindestens ein Schnitt durch die Mitte des Tumors führte.

Es wurden zwei verschiedene Transplantationsverfahren durchgeführt, die sich nur dadurch unterschieden, dass bei dem quantitativen Verfahren eine Bestimmung der Zellkonzentration (10^5 Zellen) der Suspension unmittelbar vor der Verimpfung nach unten beschriebener Methode durchgeführt wurde. Bei dem semiquantitativen Verfahren unterblieb die Bestimmung der Zellzahl, und es wurde lediglich ein Volumen von maximal 20µl injeziert (RAMA, 1987).

Die Verimpfung der ersten drei Passagen erfolgte in semiquantitativer Methode, um in der anfänglich unsicheren Phase ein Angehen der Tumorzellen zu garantieren.

Das Geschwulst wurde zur Hälfte bis zwei Drittel entfernt und dann der entnommene Teil in eine zweite Petri-Schale mit steriler Nährlösung gegeben und mittels Scherenschlag mechanisch zerkleinert. Der Rest des Tumors und das Gehirn wurden sofort in 4% Formalin fixiert.

Der zerkleinerte Tumoranteil wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und für 10 min. auf 1500 U./min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Röhrchen mit Trypsin 0.25% wieder aufgefüllt. Nach mehrmaligem Schütteln wurde der Inhalt in einem kleinen Erlmeyerkolben mit Magnetsteinchen entleert und auf dem Magnetrührer, Stufe drei mit geringster Temperatureinstellung, für 10 min. belassen.

Der Inhalt wurde erneut in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und bei selbiger Einstellung zentrifugiert. Der Überstand wird abermals dekantiert und das Röhrchen mit steriler und mit Penicillin 1%/Streptomycin 1% versetzter Nährlösung befüllt. Anschließend wird die Zellsuspension durch einen Sieb von kleinen Gewebeklumpen getrennt. Diese Lösung (in den ersten drei Passagen) oder eine daraus gewonnene Einzelzellsuspension (in den Passagen vier bis zwölf) wurden dann zur weiteren Verimpfung verwendet.

Einzelzellsuspensionen wurden aus der Erstlösung gewonnen, indem man nach dem letzten Zentrifugieren ein definiertes Volumen des sterilen und mit Antibiotika versetzten Nährmediums hinzugibt. Nach Auszählung der Zellzahl/Volumeneinheit in der Fuchs-Rosenthal-Kammer wurde das Volumen auf einen Zellgehhalt von 10^5 Zellen/mm³ verdünnt oder (nach weiterem Zentrifugieren) konzentriert so dass 5000 Zellen/µl in der Suspension vorhanden waren. Dies entsprach dann 10000 Zellen/ 20µl. Dies war dahingehend wichtig, da das maximal verträgliche Volumen bei 20 µl lag, welches von den Versuchstieren toleriert wird.

2.2.3 Intrazerebrale Verimpfung

Die Ratten wurden zu Beginn gewogen. Nach der Dosiertabelle wurde eine 1ml Einmalspritze mit den Anästhetika Rompun und Ketanest aufgezogen. Diese wurde den Ratten mit einer dünnen Nadel, wie sie bei subkutanen Injektionen verwendet wird, in den Bereich der Leiste gespritzt. Nach Einsetzen der Narkosewirkung (1-5 Minuten) wurde dem Tier das Fell am Kopf ausgezupft.

Anschließend wurde das Tier in Bauchlage auf dem Operationstisch gelagert und der Kopf im stereotaktischen Halteapparat fixiert. Nach sorgfältiger Desinfektion erfolgte mit einem Einmalskalpell ein ca. 2 cm langer medianer Hautschnitt. Dieser beginnt zwi-

schen den Ohren und endet im Nackenansatz. Zur Orientierung kann man sich vor der Schnittsetzung die Pfeilnaht durch die Kopfhaut ertasten.

Die Wundränder wurden mit zwei Häkchen auseinander gehalten und so ein 0,5 cm² großes und von Kopfhaut befreites Schädelareal geschaffen. Danach wurde mit einem stumpfen Schaber die Galea aponeurotica und das Periost vom Knochen gelöst, um die Schädelnähte zur weiteren Orientierung darzustellen.

Mit Hilfe des Handbohrer wurde ein Loch links parietal in einer Ausdehnung von 1 x 1 mm gebohrt. Mit Hilfe der Mikroliterspritze, die ebenfalls am stereotaktischen Tisch befestigt war wurden 20µl der gewonnenen Einzelzellsuspension in das Rattenhirn injiziert. Bei dieser Verimpfung wurde exakt darauf geachtet, dass nach dem Durchstechen der Dura mater, die Spritze genau 2mm tief in das Rattenhirn geführt wurde.

Nach der Injektion erfolgte der Wundverschluss mit der Einzelknopftechnik. In der Folge wurde das Tier aus dem stereotaktischen Halteapparat genommen. Alle operierten Tiere bekamen zur Identifikation Ohrmarken. Hierbei ist zu erwähnen, dass die aus Blech bestehenden Ohrmarken während der MRT Aufnahmen entfernt werden mussten. So ist zu erwägen, bei weiteren Versuchen auf Plastikmarken zu wechseln.

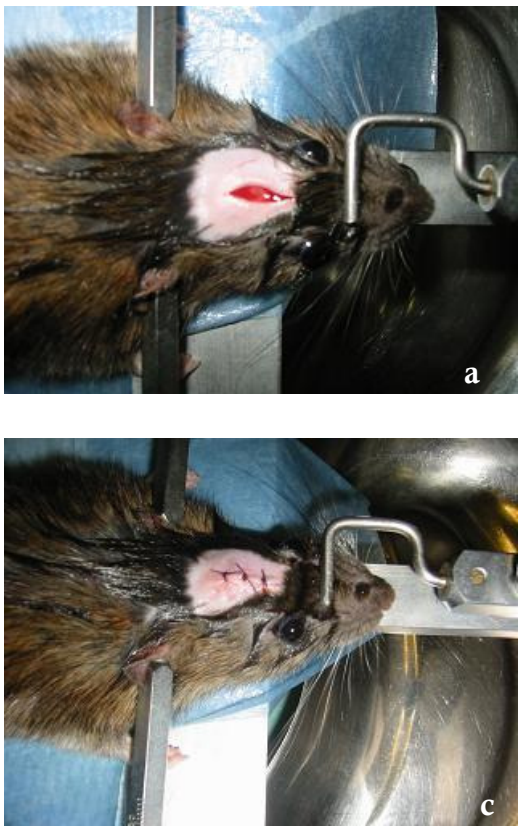


Abb. 2.6 **(a)** Hautschnitt entlang der Sutura sagittalis. **(b)** Injektion der Tumorzellen durch das Bohrloch. **(c)** Wundverschluss mit Einzelknopfnaht.

2.2.4 MR - Untersuchung

Tumortragende Ratten wurden in unterschiedlichen Abständen nach Verimpfung, beginnend mit 3 Wochen und dann 1 bis 2 mal wöchentlich mit der MRT untersucht.

Dabei wurden die Tiere wieder mit Ketanest und Rompun anästhesiert (Dosierung siehe Tabellenanhang). Bei allen Tieren, die noch keine Symptome von Hirndruckzeichen aufwiesen, kam es weder zu Narkosekomplikationen noch zu Bildstörungen durch Bewegungsartefakte. Bei vereinzelten Tieren mit ausgeprägten Symptomen des erhöhten Hirndrucks waren höhere Dosierungen der Anästhetika nötig. Die Applikation der Narkosemittel erfolgte intraperitoneal als Bolus.

Als Kontrastmittel wurde Gadolinium-DTPA (Magnevist, Schering, Berlin) angewandt in einer Konzentration von 0,5 mmol/kg KG, also 0,25 molare Lösung in Kochsalz, ebenfalls intraperitoneal injiziert. Von einer Injektion in die Schwanzvenen sahen wir ab, da ein häufiges Gebrauchen der Venen zu Komplikationen führen kann, wie Nekrosen. Trotz Bolusgabe ließ sich ein annähernd konstanter Kontrastmittelspiegel während der MR-Untersuchungen realisieren.

Die Bildgebung wurden an einem 1.0 clinical scanner Magnetom Expert™ der Firma Siemens, Erlangen, durchgeführt das für klinische Routineuntersuchungen benutzt wird,. Dabei wurden eigens konstruierte Kleintiervolumenspulen eingesetzt.

Bilder wurden mit T1 - und T2 – gewichteten 3D Echo Sequenzen, zunächst in koronarer Schichtung hergestellt.

- constructive interference of steady state (CISS) 3D; TR: 16.7ms, TE 8.1 ms, FA 70°, FOV: 100mm x 50mm; matrix: 256 x 128; Schichtdicke: 36mm, Schichten: 40; Voxelgröße: 0,39 x 0,39 x 0,9mm^3; Aquisitionszeit: 2 Minuten 25 Sekunden.
- Double echo in steady state (DESS) 3D; TR: 26.8ms; TE: 9.0ms; FA: 40°; FOV: 80mm x 40mm; matrix: 256x128; Schichtdicke: 36mm; Schichten: 40 ; Voxelgröße: 0.31x0.31x0.9mm^3 ; NEX: 1; Aquisitionszeit: 5min 30 s.
- Fast low angle shot (FLASH) 3D; TR: 41.0 ms; TE: 8.1 ms; FA: 40°; Aquisitionszeit: 8 min u. 46 s

Anschließend wurden Bilder mit T2 gewichteten, Turbo Spin Echo Sequenzen in transversaler Schichtung berechnet.

- TR: 2730ms; TE: 96ms; FA: 40°; FOV: 80mm x 80mm; matrix: 140x256; Schichten: 15; Schichtdicke: 2mm; Pixelgröße: 0.4x.0.4mm^2 ; NEX: 1; Aquisitionszeit:

2.2.5 Interactive Watershed Transform

Die Bildsegmentierung ist der anspruchsvollste Teil fast aller Bildanalyse- und Visualisierungssysteme für medizinische Diagnose- und Therapieplanung. Es steht eine ganze Reihe von vollautomatischen Methoden der Bildsegmentierung, für eine gewisse Anzahl an spezialisierten Aufgaben (ATKINS u. MACKIEWICH, 1998), zu Verfügung. Jedoch ist die Zahl der Systeme, die interaktive kontrolliert und korrigiert werden kann, besonders bei der Bearbeitung von drei- und vierdimensionalen Daten, sehr gering. In der klinischen Anwendung sind die automatischen Methoden häufig bei umfangreichen anatomischen und pathologischen Strukturen und deren Varianten nicht ausreichend.

Die IWT ist eine neuartige Methode zur effektiven Bearbeitung von multidimensionalen Graustufenbildern (HAHN u. PEITGEN, 2003). Sie basiert auf der WT Methode und einem erstmalig verwendeten Ordnungssystem.

Die IWT wurde bei verschiedenen medizinischen Aufnahmen erfolgreich angewandt, wie z.B. bei Vermessungen und volumetrischen Bestimmung neuroanatomischer Strukturen. Die Methode der IWT vereint automatische und effiziente interaktive Kontrolle in einem Algorithmus und verhindert weitestgehend eine Übersegmentierung, welche ein typisches Problem der herkömmlichen WT ist (HARIS, 1998).

2.2.6 Fixierung und Einbettung von Biopsiematerial für die Histologie

Das Gewebematerial wurde bis zur weiteren Verarbeitung in 4% gepuffertem Formalin in verschraubaren Glasbehältern aufgehoben. Vor der weiteren Verarbeitungen wurde das Material jedoch wenigstens 5. Tage in der Fixierlösung belassen. Bei stark mit Blut behaftetem Gewebematerial wurde das Formalin täglich erneuert. Für die gewünschten Paraffinschnitte wurde das fixierte Material gewässert, um das überschüssige Formalin auszuspülen. Hierauf folgte die 15minütige Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe.

Diese sieht wie folgt aus:

- je 5-10 Minuten in 70 %-gen Alkohol
- je 5-10 Minuten in 96 %-gen Alkohol

- je 5-10 Minuten in 100 %-gen Alkohol
- je 10 Minuten in Xylol

Anschließen wurde das Material in Paraffin eingebettet. Von den fertigen Paraffinblöcken wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Über Nacht wurde dann, in einem Brutschrank, das Paraffin bei einer Temperatur von 37 ºC ausgeschmolzen. Am Nächsten Tag wurde über absteigende Alkoholreihe, mit Xylol von der Firma Roth, beginnend, entparaffiniert. Dieser Vorgang dauerte, wie die aufsteigende Alkoholreihe 15 Minuten. Im Anschluss die Verwendung der gewünschten Färbung (HE, Kresyl oder Immunperoxidase). Nach der Färbung erfolgte eine erneute aufsteigende Alkoholreihe, von 15 Minuten, zur Entwässerung. Danach Xylol und abschließend mit Corbid-Balsam von der Firma Hecht, eindecken.

2.2.7 Hämalaun Eosin Färbung der Paraffinschnitte

Entparaffinierte Schnitte wurden wie folgt gefärbt:

- Schnitte aus Aqua dest für je 5 Minuten in Hämalaunlösung von der Firma Roth, Germany
- Kurz mit Aqua dest spülen
- in Leistungswasser für 10 Minuten bläuen
- Schnitte für je 5 Minuten in Eosinlösung von der Firma Merck, Germany
- über aufsteigende Alkoholreihe entwässern
- Xylol und anschließend mit Carbid-Balsam eindecken

Bei der Hämalaun Eosin (HE) Färbung werden alle basophilen Zell- und Gewebestrukturen (z. B. Chromatin der Zellkerne, manche Zytoplasmabestandteile, Teile der Knorpelgrundsubstanz) blau angefärbt, alle azidophilen Bestandteile (z.B. Zytoplasma, die meisten Interzellularsubstanzen) rot.

2.2.8 Kresylviolettfärbung der Paraffinschnitte (Nissl-Färbung)

Entparaffinierte Schnitte wurden wie folgt gefärbt:

- mit Aqua dest abgespülte Schnitte für 15 Minuten in wässriges Kresylviolett von der Firma Merck, Germany
- erneutes Abspülen mit Aqua dest
- in 70 % Alkohol kurz baden
- Differenzieren in 96 % Alkohol (evtl. mit einigen tropfen Essig versetzt)

- mit 96 % Alkohol kurz abspülen
- in 100 % Alkohol je 2 mal für 1 bis 2 Minuten baden
- je 2 mal in Xylol kurz eintauchen
- anschließend mit Corbid Balsam eindecken

Bei dieser Färbung werden die Zellkerne und Nissl Substanz violett und der Rest der Zelle schwach blau angefärbt. Die verwendete Kresyl-Gebrauchslösung bestand aus 1g Kresylviolett (Acetat), 25 g Fa. Merck 5235 mit Aqua dest auf 100 ml aufgefüllt und gut verrührt. Im Anschluss wurde die Farbe filtriert.

2.2.9 Färben mit der Immunperpoxidase Färbemethode

Es gibt vier haupsächliche Immunperoxidase-Färbemethoden, um zelluläre Antigene zu lokalisieren. Die direkte, indirekte, PAP- und Avidin-Biotin-Methode. In unserem Fall wurde die PAP-Methode verwendet. Bei dieser Methode werden 3 Reagenzien gebraucht: Primärantikörper, Sekundärantikörper und der PAP-Komplex, bestehend aus dem Enzym Peroxidase und einem Antikörper gegen Peroxidase.

Eine der wichtigsten Anwendungen der PAP-Methode liegt in der Bestimmung eines Tumorsprungs, indem von Zellen produzierte spezifische Antigene identifiziert werden. Das gewährleistet eine genauere Klassifikation, besonders bei schlecht differenzierten und metastasierten Tumoren, als sie allein durch eine morphologische Beurteilung erfolgen könnte.

Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

- Entparaffinieren eines 4 µm dicken, fixierten Schnittes des Tumormaterials. 10 Minuten in Xylol + Rehydrierung durch absteigende Alkoholreihe zu Wasser.
- Blockierung der unspezifischen Hintergrundfärbung mit H_2O_2-Methanol Gemisch (10ml H_2O_2/100ml Methanol) für 20 Minuten. Anschließend spülen mit PBS (Phosphat-Puffer bei 7.4).
- Weitere Abschirmung der endogenen Peroxidase mit Rinderserum 1:5 verdünnt (ca. 100µl pro Schnitt) für 20 Minuten. Ansetzen von: - RS 1:5 verdünnt (1ml RS + 4ml Puffer) und – RS 1.5% (300µl RS + 20ml Puffer).
- Auftragen des Primärantikörpers jeweils nach Bedarf: in 1.5% RS/PBS (ca. 100µl pro Schnitt). Angesetzt mit 500µl 1.5% RS pro Küvette. Im Anschluss Spülen mit PBS. Dauer 45 Minuten.

- Auftragen des Sekundärantikörpers gegen Maus-AK biotibilirter ZAK F1.1 (Ziege-Anti-Kaninchen) ca. 100µl pro Schnitt und ansetzen mit 1.5% RS/PBS (300µl). Dauer 30 Minuten. Hiernach Spülen mit PBS.
- Strept AB-Komplex/HRP F1.2 mindestens 15 Minuten vorher ansetzen. Dauer 30 Minuten. Anschließend Spülen mit PBS.
- DAB (Diaminobenzidin)-Reaktion. Dauer 10 Minuten. Achtung giftig! A: 1ml DAB + 9ml PBS; B: 10ml PBS + Pipettenspitze in LSG A geben.
- Hämalaun Gegenfärben, 10 Minuten bläuen
- Entwässern (aufsteigende Alkohol Reihe)
- Eindecken

2.2.10 Lichtmikroskopische Morphometrie

Morphometrie ist eine Methode zur quantitativen Analyse makroskopischer und mikroskopischer Objekte, welche Körper-, Organ-, Gewebe- und Zellkompartimente umfassen (WEIBEL, 1979). Ziel ist eine möglichst objektive und reproduzierbare Beschreibung biologischer Strukturen. Die Vermessung lichtmikroskopischer Präperate ist dabei eines der Hauptverwendungsgebiete.

Die in dieser Arbeit untersuchten Tumorschnitte waren hinsichtlich ihrer Form, Größe und Verteilung charakterisierbar und durch spezifische Färbemethoden eindeutig darstellbar.

Ihre Vermessung erfolgte mit einer nicht automatischen, stereologischen Methode. Hierfür wurde ein Lichtmikroskop der Firma Zeiss, mit einer Okkularvergrößerung von 40, Objektiv x10, einem Gewebefaktor von 1,25 und einem 10x10 mm Flächenraster verwandt.

Zur Berechnung wurde der jeweilige Schnitt vermessen, auf dem der Tumor die größte Schnittfläche aufwies. Zu messen war einmal der horizontale (a) und der vertikale (b) Durchmesser. Die Messwerte wurden dann in die Flächenformel der Ellipse ($A= \pi*a*b$) eingesetzt. Da a und b in der Formel jeweils für den Radius und nicht den Durchmesser stehen, müssen die Werte von a und b durch zwei geteilt werden. Die Halbachsen a und b sortiert man so, dass $a > b$ gilt.

Um das Volumen des Ellipsoid nach der Formel $V= 4/3*\pi*a*b*c$ berechnen zu können setzen wir $b = c$.

2.2.11 Statistische Auswertungsmethodik

2.2.11.1 Trendtest

Um den Trend bei den Induktionszeiten zu bestätigen wurde der Trendtest (von NEUMANN et al., 1941; vgl. auch MOORE, 1955) angewandt. Ein einfacher Trendtest anhand der Dispersion zeitlich aufeinanderfolgender Stichprobenwerte x_1, x_2,...,x_i,…, x_n, die einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen, basiert auf der in üblicher weise ermittelten Varianz und dem mittleren Quadrat der n-1 Differenzen aufeinanderfolgender Werte, der sukzessiven Differenzstreuung (mean square successive difference) Δ^2 (Delta-Quadrat):

$$\Delta^2=\sum (x_1-x_{i+1})^2 / (n-1)$$

Sind die aufeinanderfolgenden Werte unabhängig, wird $\Delta^2 \approx 2s^2$ oder $\Delta^2/s^2 \approx 2$. Sobald ein Trend vorliegt, wird $\Delta^2 < 2s^2$, da dann benachbarte Werte ähnlicher sind als entfernte, d.h. $\Delta^2/s^2<2$. Die Nullhypothese (aufeinanderfolgender Werte sind unabhängig) muss zugunsten der Alternativhypothese (es besteht ein Trend) aufgegeben werden, sobald der Quotient

$$\Delta^2=\sum (x_1-x_{i+1})^2 / \sum (x_1-x)^2$$

die kritischen Schranken erreicht oder unterschreitet (HART, 1942).

2.2.11.2 Bland-Altman-Diagramm

Viele klinische Messungen sind nicht besonders genau. Entweder ist es unmöglich das zu untersuchende Objekt direkt zu vermessen, wie zum Beispiel einen intracerebral wachsenden Tumor, oder die Vermessung, wenn auch direkt möglich, gestaltet sich in ihrer Durchführung sehr aufwändig. Des Weiteren stellen zu messende Werte ein Problem dar, die sich im zeitlichen Verlauf häufig ändern.

Wegen all dieser Unsicherheiten gibt es eine große Anzahl an Methoden, von denen die Methoden-Vergleichstudie nach Bland und Altman häufig genutzt wird. Das Ziel solcher Studien ist es für gewöhnlich zu sehen, ob die untersuchten Methoden so gut übereinstimmen, dass das neue Verfahren das Alte ersetzen kann, oder zumindest genau so gut zu verwenden ist.

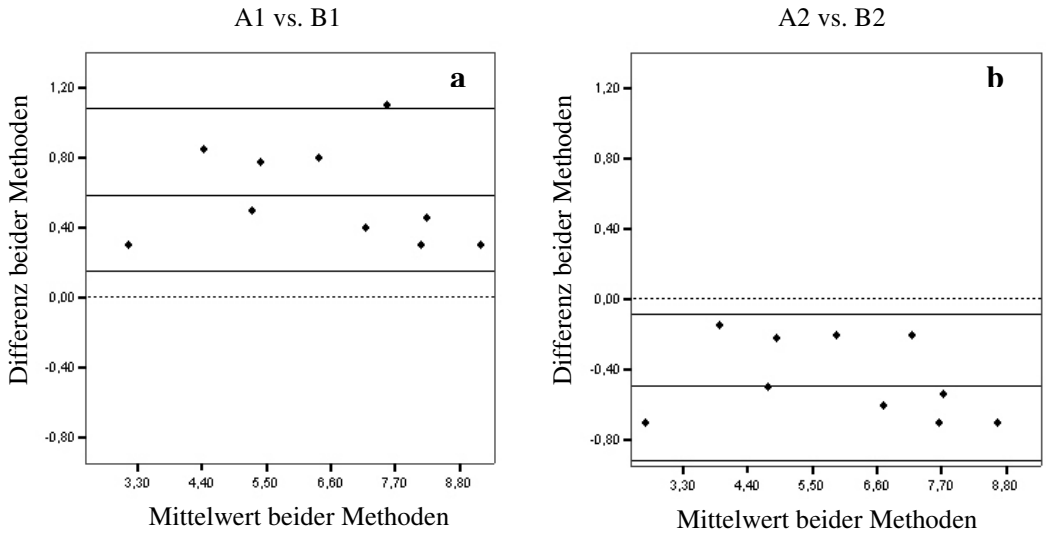
Mit der LoE (Line of Equality) lässt sich schon sehr gut eine Übereinstimmung, von zwei untersuchten Methoden, darstellen. Eine sehr gute Alternative zur LoE, stellt das

Bland-Altman-Diagramm dar. Es offenbart mehr und graphisch besser dargestellt Informationen, indem die absolute intraindividuelle Differenz zwischen beiden Methoden gegen den Mittelwert beider Methoden aufgetragen wird.

Diese Art der Darstellung hat den Vorteil, dass sie die Größe der Differenz und deren Verteilung um den Nullwert graphisch besser darstellt und anhand des Diagramms geprüft werden kann, dass die Differenz unabhängig von der Größe der Messwerte ist. Einen sehr guten Einstieg in Methoden-Vergleichsstudien gibt die Arbeit von BLAND und ALTMAN (1999).

Die absoluten intraindividuellen Differenzen zwischen A und B (Beispieldiagramm) werden entsprechend deskriptiv analysiert, um die Größenordnung und damit die klinische Relevanz möglicher Abweichungen zwischen den Messmodi charakterisieren zu können. Graphisch werden diese Abweichungen sowie solche zwischen den beiden Methoden A und B in Bland-Altman-Diagramm gegen den Mittelwert beider Messwerte aufgetragen, um die Übereinstimmung der jeweiligen Messverfahren in Abhängigkeit von der absoluten Größenordnung beurteilen zu können.

Die mediane Differenz und der 95%-Übereinstimmungsbereich (gekennzeichnet durch die 2,5te und 97,5te Perzentile) werden mit einer durchgezogenen Linie dargestellt. Die Abweichung vom Nullwert (Übereinstimmung der Messergebnisse) wird durch eine gestrichelte Linie veranschaulicht.



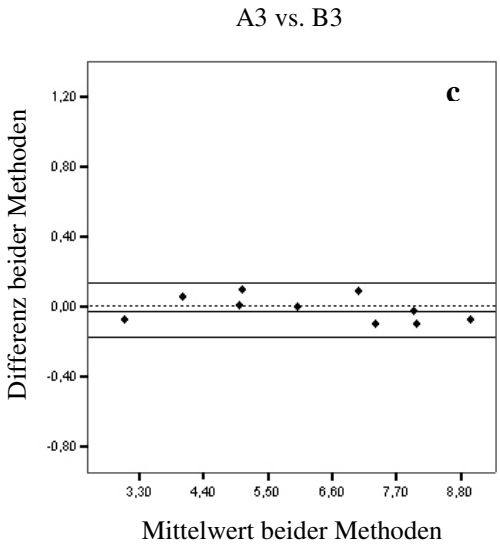


Abb. 2.7 Bland-Altman-Diagramme zur graphischen Darstellung der absoluten intraindividuellen Differenz zwischen zwei Methoden (A1-A3 u. B1-B3), welche gegen den Mittelwert der beiden jeweiligen Messwerte aufgetragen werden. Durchgezogene Linie: mediane Differenz und 95%-Übereinstimmungsbereich. Gestrichelte Linie: Abweichung vom Nullwert (Bias). **(a)** A1 versus B1, es liegt eine Überbewertung vor. **(b)** A2 versus B2, Beispiel für eine dafür, dass eine der Methoden unterbewertet. **(c)** A3 versus B3, beide Methoden ähneln sich stark in ihren Werten.

3 Ergebnisse

3.1 Primärtumorinduktion

Von dem Wurf des Tieres, das am 15. Tag der Trächtigkeit p. c. 50 mg pro kg Körpergewicht ÄNU erhalten hatte, gelang es, alle vier Jungtiere (Nr. 872, 873, 874, 875) aufzuziehen. Bis zum Auftreten von durch Tumorwachstum im ZNS bedingten pathologischen Auffälligkeiten, zeigten die Versuchstiere bei der täglichen Beobachtung einen normalen Gesundheitszustand und unauffälliges Wachstum. Die ersten diskreten Symptome traten etwa zwei Wochen bis wenige Tage vor dem Versterben der Tiere auf.

Alle vier Tiere entwickelten nach unterschiedlicher Latenzzeit Tumoren des Zentralennervensystems. Der Tumor eines der vier Tiere (Nr. 873) wurde für die Erzeugung der Transplantationstumorlinie G-XIX verwendet.

3.1.1 Primärtumorinduktionszeiten

In dieser Arbeit wurde die Induktionszeit bei den Primärtumoren als die Zeit definiert, die zwischen der transplazentaren Applikation des Karzinogens und dem Todeszeitpunkt des Versuchtieres lag. So lagen die beobachteten Induktionszeiten bei den vier Nachkommen bei 184. bis 214. Tagen. Die errechnete durchschnittliche Induktionszeit betrug 200,25 Tage.

3.1.2 Deskriptive morphologische Ergebnisse der Histologie (Primärtumor)

Bei der autoptischen und mikroskopisch-histologischen Untersuchung wurden bei zwei Nachkommen (T872 u. T875), der Primärtumorreihe (T872 bis T875), intracerebrale Tumorfrühstadien, sogenannte Mikrotumoren und bei den restlichen zwei Nachkommen (T873 u. T874) Hemisphärengliome diagnostiziert.

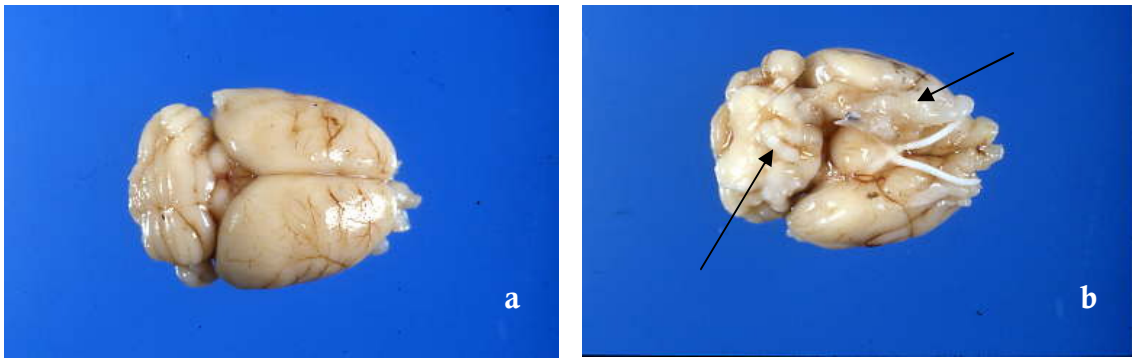


Abb. 3.1 Primärtumor T874: **(a)** Großhirn mit Kleinhirn von kranial, ohne sichtbaren Primärtumor. **(b)** Großhirn mit Kleinhirn, sowie Hirnnerven von kaudal; deutlich sichtbarer Tumor, der durch sein expansives Wachstum die linke Hemisphäre und den Hirnstamm verdeckt.

3.1.3 Makroskopische Befunde

Bei der Sektion von zwei Labortieren wurde schon beim Eröffnen des Schädels ein blutiges Geschwulst in der Hirnmasse beobachtet. Beim Durchschneiden des fixierten Gehirns wurden infiltrierend wachsende, am Rande glasige aussehende Malignome von beträchtlicher Ausdehnung gesehen. Sie zeigten multifokale Nekrosen besonders in den zentralen Teilen des Tumors (siehe Abb. 3. 2 b) oder auch ältere Blutungen.

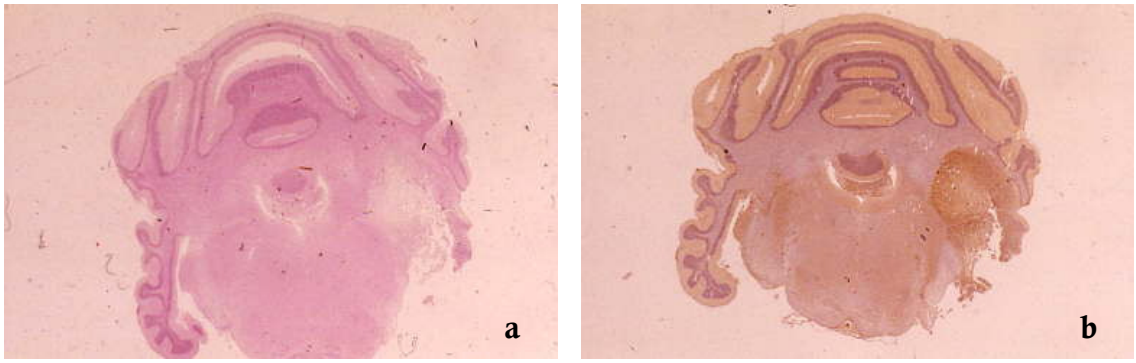


Abb. 3.2 Primärtumor T 873: **(a)** Präperat in der HE-Färbung **(b)** und in der Mib-1-Proliferationstätigkeit: Es zeigt sich auf der Tumorseite, vor allem in der Randzone eine sehr deutliche Positivität für den genannten Priliferionsmarker. Dies weist daraufhin, dass im Zentrum schon nekrobiotische Veränderungen ablaufen.

Ferner fanden sich in den übrigen zwei Gehirnen sehr kleine gut abgegrenzte „Mikrotumoren“, deren Entdeckung und Lokalisation in einem Fall (T872) nicht mit Hilfe des MR-Tomographen festgestellt werden konnte. Er wurde erst durch die histologische Aufarbeitung sichtbar.

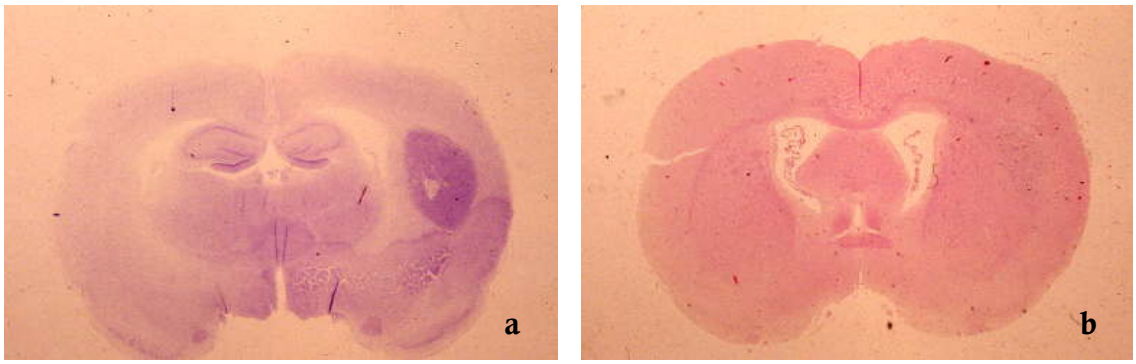


Abb. 3.3 Doppelhemisphärenschnitt des Primärtumors T 875 einmal in **(a)** Kresylviolett und **(b)** HE angefärbt: Relativ gut begrenzter; homogener Mikrotumor mit zentraler Nekrose.

3.1.4 Mikroskopische Befunde

Die Mikrotumoren fanden sich an den bekannten Prädilektionstellen. Eine dieser Vorzugslokalisationen ist die subependymale Zone. In vorangegangenen Untersuchungen fanden sich dort kleine Tumorknötchen direkt neben der Ependymauskleidung der Ventrikel, häufig nahe an den Ventrikelwänden lokalisiert. Das Hauptwachstum erfolgte allerdings zwischen den Fasern der weißen Substanz parallel zur Ventrikeloberfläche. Anhand einer unserer Primärtumoren (T872) konnten wir diese Beobachtungen bestätigen.

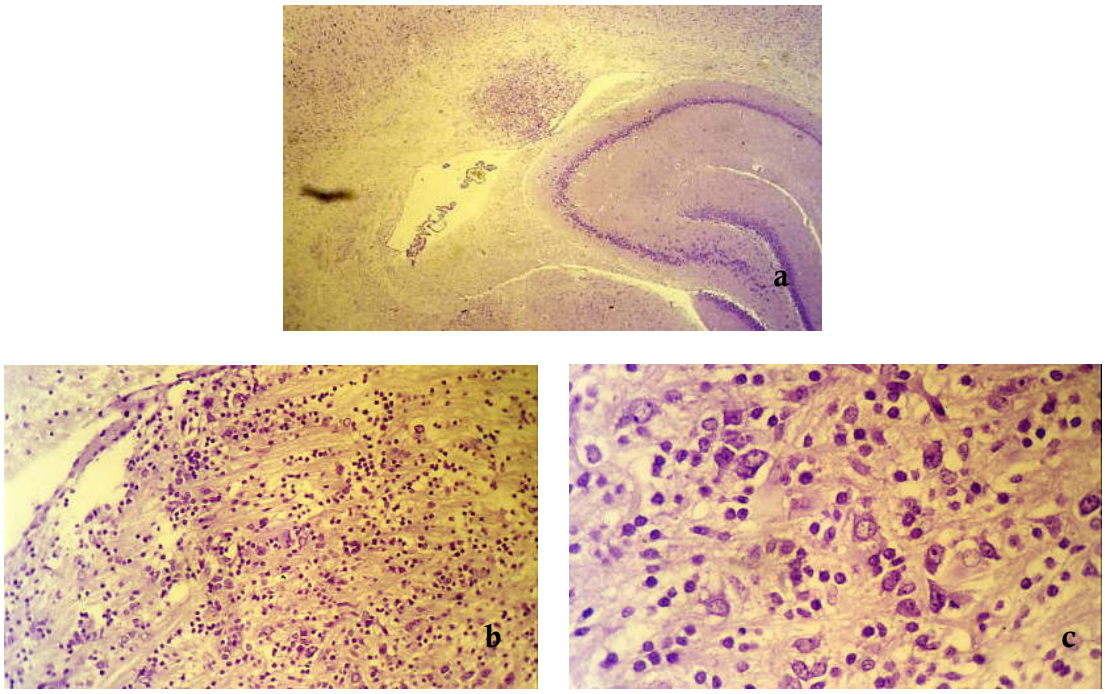
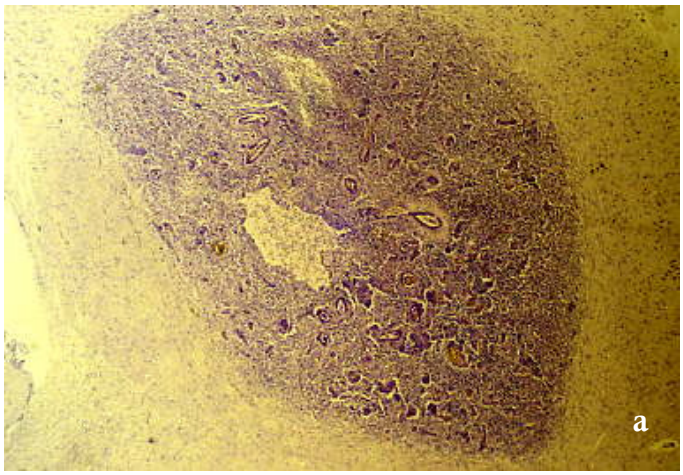
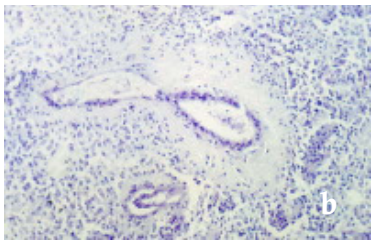


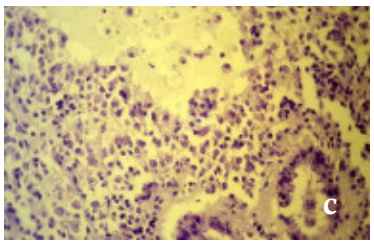
Abb. 3.4 Histologische Bilder des Primärtumors T 872 in Kresylviolett: **(a)** Mikrotumor mit Wachstum in der subependymalen Zone in 2.4 facher Vergrößerung. **(b)** 16 fache Vergrößerung des Tumors. Hier sieht man, dass nunmehr ein etwas gleichmäßiger Besatz an kleinen Rundzellen ohne Zytoplasma und größeren Zellen mit gut gezeichnetem, astrozytär anmutenden Zytoplasma vorhanden ist Es handelt sich um ein Mischgliom. **(c)** Man erkennt deutlich bei 40 facher Vergrößerung die großen astrozytären Zellen mit gezeichnetem Zytoplasma und kleineren Zellen mit hyperchromatischen Kern, die angedeutet Honigwaben bilden.

Eine weitere beobachtete Wachstumsvariante von Mikrotumoren war die, dass die Tumoren nicht direkt an die Ventrikelwand angrenzten, aber offensichtlich durch, häufig durch die Fasern der weißen Substanz unterbrochen, Zellbrücken mit benachbarten Mikrotumoren, die subventrikulär lagen, in Verbindung standen (MENNEL et al., 1986).

Einige Tumorfrühstadien, die in der Vergangenheit untersucht wurden, hatten keine Verbindung zum Ventrikelsystem. Diese Mikrotumoren waren überwiegend in der weißen (selten in der grauen) Substanz lokalisiert worden. Eine solche Wachstumsvariante trat in unserer Primärtumorreihe bei einem der zwei Mikrotumoren (T875) auf. Die Zellzusammensetzung der Tumoren war unterschiedlich.







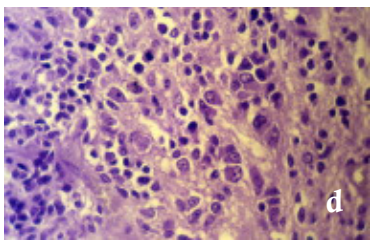


Abb. 3.5 Alle vier Aufnahmen zeigen den kompakten Mikrotumor T 875 in Kresylviolettfärbung: **(a)** 2.4 fach vergrößerte Übersichtsaufnahme. **(b)** Perivaskuläres Wachstum, 16 fache Vergrößerung. **(c)** Deutliche Gefäßproliferation, die ein charakteristisch, oligodendroglöses Merkmal ist. **(d)** Kleinzelliges oligodendrogliomatöses Wachstum.

Die Tumoren, die in Verbindung mit der Ventrikelauskleidung standen, wiesen zwei verschiedene Zelltypen auf. Einerseits fanden sich kleine von der interfaszikulären Oligodendroglia abstammende Zellen, die häufig in Strängen angeordnet waren. Sie wurden in zunehmender Nähe zu den Mikrotumoren breiter und bildeten innerhalb der Tumoren kleine Inseln. In den Anhäufungen dieser kleinen traten regelmäßig Zellen mit größeren und weniger intensiv angefärbten Kernen auf. Zahlenmäßig traten diese Zellen gegenüber denen mit kleineren und dunkler gefärbten Kernen zurück.

Tumoren ohne erkennbare Verbindung zur Ventrikelbegrenzung wiesen nur eine Zellart auf. Diese waren von der interfaszikulären Glia abstammende kleine Zellen, die zwischen den Fasern der weißen Substanz lagen. Teilweise fand sich bei diesen Tumoren das von Oligodendrogliomen bekannte Bild der honigwabenähnlichen Strukturen.

Solche Mikrotumoren, die ausschließlich oligodendrogliaartige Zellen aufwiesen, zeigten keine Anfärbung bei der GFAP-Peroxidase Methode. Im Gegensatz dazu fanden sich in allen Tumoren, die wie gerade dargestellt aus zwei verschiedenen Zelltypen bestanden, positive Anfärbungen durch die GFAP-Peroxidase Färbemethode. Dabei konnten die GFAP-positiven Zellen identifiziert werden als die weniger häufige Zellpopulation mit den großen blass angefärbten Zellkernen. In allen GFAP-positiven Mikrotumoren fanden sich auch leichte Anfärbungen mit der gliafaseranfärbenden Kanzler Methode (MENNEL et al., 1986).

Die anderen zwei großen Primärtumoren (T873 u. T874) waren Hemisphärengliome mit der bekannten Morphologie des (polymorphen) Mischglioms. In den Anilinfärbungen findet man eine bunte Mischung klein- und großkerniger Zellen, die traditionsgemäss als Oligodendrozyten und Astrozyten angesprochen werden (siehe Mikrotumoren ohne Verbindung zum Ventrikelsystem), auch wenn der Nachweis des sauren Gliafaserproteins nicht immer gelingt. Mit zunehmender Größe der Tumoren trat eine vermehrte Anaplasie auf.

Des weitern konnten Kernteilungsfiguren, Kernpyknosen (Apoptose), Gefässproliferationen reichlich gebilderter kleiner Kapillaren und unterschiedlich groß geformte Nekrosefelder mit teilweise hämorrhagischen Inhalt dargestellt werden.

3.2 Tumortransplantation

Es gelang nach dem im Abschnitt 2.2.2 beschriebenen semiquantitativen (Passage 1 bis 3) und quantitativen Verfahren die Transplantationstumorlinie G-XIX, mit dem Tumor des Versuchstieres Nr. 873, zu etablieren.

Der Buchstabe G steht für Gliom, die römische Zahl bezeichnet die fortlaufende Nummerierung der von verschiedenen autochthonen Gliomen abstammenden Tumorlinien des Instituts. Des weiteren wird eine arabische Zahl, die die jeweilige Transplantationspassage darstellt, an die Tumorlinienbezeichnung angehängt.

Für die Fortführung und der Tumorlinie war eine tägliche Kontrolle der inoculierten Tiere erforderlich, um rechtzeitig bei auftreten von Hirndruckzeichen zu transplantieren und den Verlust der Tumorlinie durch Tod der Versuchstiere zu vermeiden.

Um in jedem Stadium des Tumorwachstums MRT Aufnahmen zu erlangen und eine möglichst kleine zeitliche Differenz zwischen Todeszeitpunkt des Versuchtieres und letzter MRT Messung zu gewährleisten, war die tägliche Kontrolle der Tiere ebenfalls sehr wichtig.

3.2.1 Induktionszeiten der Transplantationstumoren

In der Tumorlinie G-XIX wurden in den ersten drei Passagen, die Transplantationen in der semiquantitativen Methode durchgeführt. In den darauf folgenden neun Passagen wurde dann die quantitative Methode benutzt.

Das Wachstumsverhalten maligner Tumoren nimmt im allgemeinen während der Anfangsphasen nach Überschreiten einer Schwelle exponentiellen Charakter an, um in

späteren Phasen, wenn der Zellverlust der Geschwülste sich der Neubildungsrate annähert, von der exponentiellen Entwicklung abzuweichen und sich einer plateauförmigen Kurve anzunähern (RAJEWSKI, 1975).

Ab der 11. Passage verkürzte sich die Induktionszeit auf durchschnittlich 30 Tage. Gleichzeitig nahm der Tumor ein einheitliches Zellbild an. Es handelt sich dabei um ein entdifferenziertes Gliom (TATOR et al., 1977). Es ist zu vermuten, dass sich bei höheren Passagen eine weitere Verkürzung der durchschnittlichen Induktionszeit einstellt.

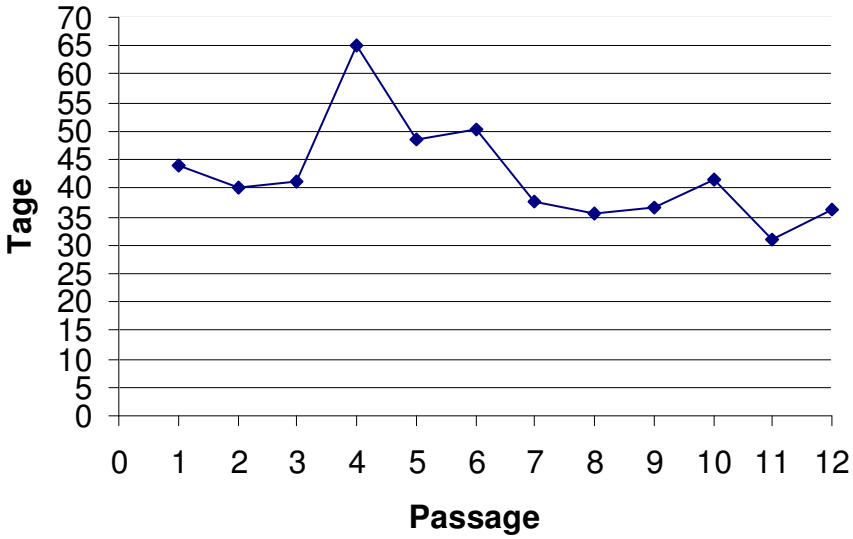


Abb. 3.6 Gemittelte Induktionszeiten der Passage eins bis zwölf aus der Transplantationstumorlinie G-XIX.

Der Trendtest nach NEUMANN (1941) bestätigt den sich im in Abb. 3.6 abzeichnenden Trend. Der Quotient aus der mittleren quadratischen sukzessiven Differenzenstreuung und der Varianz beträgt 0,7195. Somit liegt, unter Berücksichtigung der kritischen Schranken, ein Trend vor. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei $< 5\%$.

Die Daten der ersten drei Passagen wurden bei der Trenderhebung nicht berücksichtigt, da in diesen Passagen nicht quantitativ verimpft wurde, d.h. es wurde nicht wie in den folgenden neun Passagen 10^5 Zellen pro Tumor injiziert.

3.2.2 Deskriptive morphologische Ergebnisse der Histologie (Transplantationstumoren)

Abb. 3.7 Großer Transplantationstumor T 789, in der re. Hemisphäre des Rattenhirns. Deutlich erkennbar die alte, eingeblutete Injektionsstelle.

3.2.3 Makroskopische Befunde

Die meisten Transplantationstumoren hatten ihren Wachstumsursprung im Bereich der Verimpfungsstelle, wuchsen stark expansiv und zerstörend. Sie infiltrierten das umgebende Parenchym, entwickelten sich streng intracerebral und brachen fast alle in das Liquorsystem ein. Die Tumoren waren in ihren Ausmaßen immens und konnten die Dimension einer ganzen Hemisphäre einnehmen. Bei manchen Tumoren wurde auch die zweite Hemisphäre mit einbezogen.

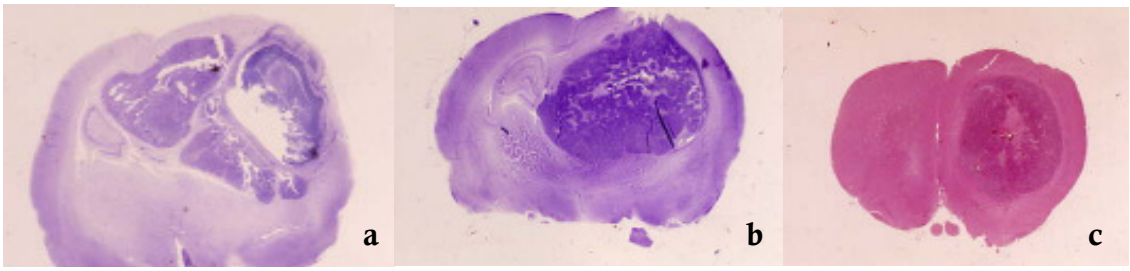


Abb. 3.8 Streng intracerebrales Wachstum in verschiedenen Passagen : **(a)** Tumor T 781/P 03 aus einer frühen Passage mit Wachstum in den beiden Großhirnhemisphären mit übergreifen auf die Gegenseite. Die Ammonsformation der Gegenseite ist verdrängt und auf der primären Tumorseite ist die Ammonsformation ins Wachstum einbezogen. **(b)** T 058/P 10 Nach zehn Passagen zeigt sich ein deutlich homogenes Wachstum. Wiederum ist die Ammonsformation der Gegenseite verdrängt. Unterhalb der Ammonsformation auf der Gegenseite hat sich ein druckbedingter Infarkt ausgebreitet. **(c)** T 060/P 11 In der elften Passage zeigt sich frontal ein fast homogen anmutendes gleichförmiges Wachstum.

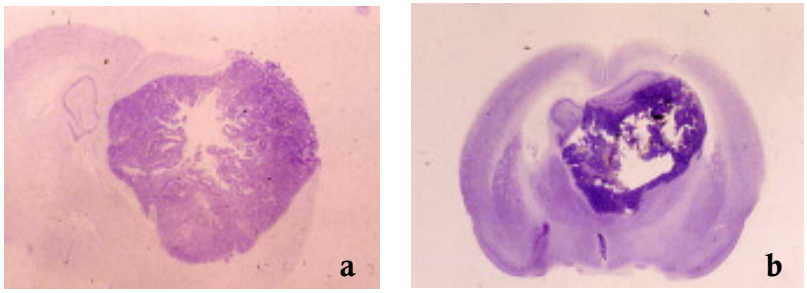


Abb. 3.9 Auch in den späteren Passagen kommen bei stärkerem Wachstum regressive Veränderungen vor. Diese betreffen Zysten und Nekrosen und liegen im allgemeinen in der Mitte des Tumors: **(a)** T 064/P 12 Kresylvilett mit Ausbreitung auf die Gegenseite. **(b)** T 054/P 09 elativ gut begrenzter, homogener Tumor mit zentraler Nekrose.

Einige Tumoren breiteten sich entlang des Stichkanals in den Subarachnoidalralraum aus, ohne dass eine Infiltration durch die Pia mater in die Hirnsubstanz vorkam.

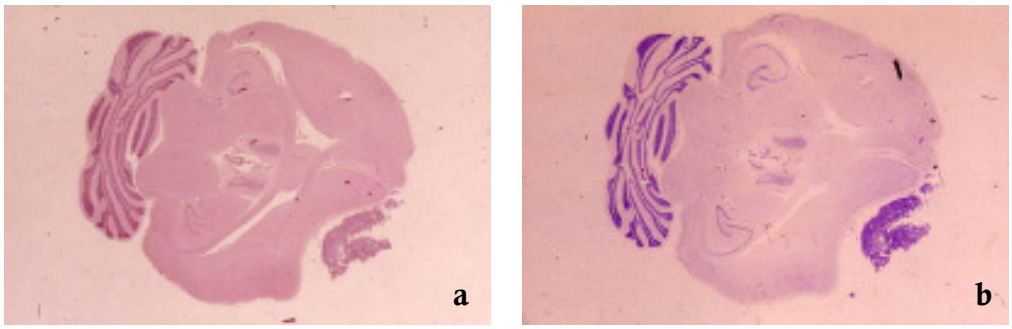


Abb. 3.10 a und b HE- und Kresylvilett-Präperate eines subarachnoidal sich ausdehnenden Tumors, der von außen nach rechts fromtal eindringt: **(a)** und **(b)** T 904/P 02.

Bis auf diese Ausnahmen gab es keine bedeutenden Unterschiede im Wachstumsverhalten der Tumoren in den zwölf untersuchten Passagen. Beide Wachstumsformen führten zu ausgeprägten Steigerung des intracerebralen Drucks und erheblichen Raumforderungen mit Hirnverdrängung.

3.2.4 Mikroskopische Befunde

Die Histologie der Transplantationstumoren in den ersten zehn Passagen war geprägt von zellulären Pleomorphismen. Es bestand eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Primärtumor (T873), unabhängig davon, ob es sich um ein intra- oder extracerebral lokalisiertes Geschwülst handelte (MENNEL, 1982).

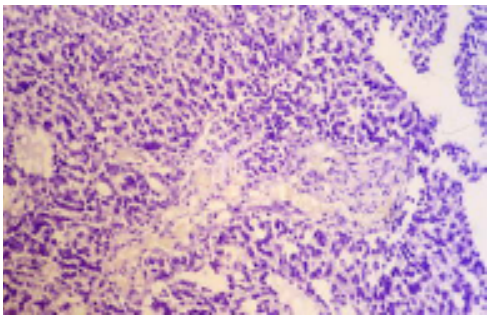


Abb. 3.11 T 904/P 02 Objektiv-Vergrößerung x16 Dieses Präperat gibt eine Übersicht von verschieden Wachstumsmuster dieser Tumoren.

Die Tumoren hatten zum einen überwiegend Merkmale von Oligodendrogliomen andere tendierten mehr zu Ependymome, Astrozytom oder waren Mischgliome.

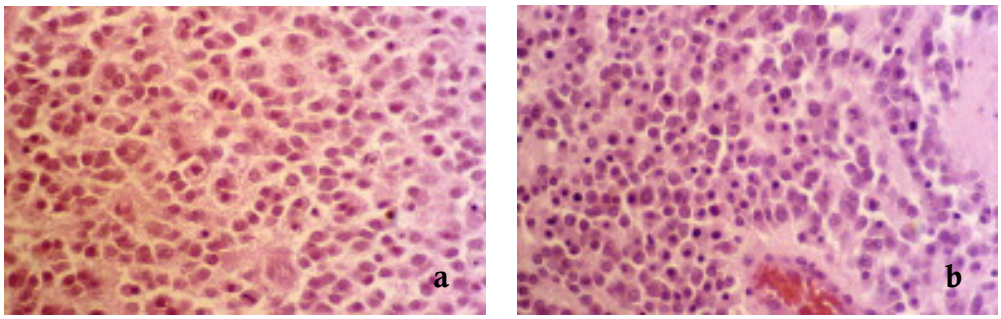


Abb. 3.12 a und b Diffuses großzelliges, teils perivaskulär (b), teils diffuses Bild zweier rein astrozytärer Tumoren: **(a)** T781/P 03 HE-Färbung Objekt-Vergrößerung x40. **(b)** T 783/P 04 He gefärbtes Präparat in 40 facher Vergrößerung.

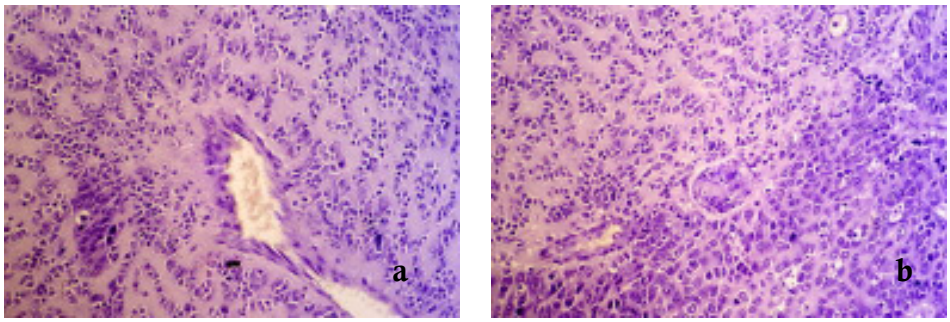


Abb. 3.13 a und b zeigen verschiedene Wachstumsmuster in dem Tumor T 038/P 06 bei 16 facher Vergrößerung: **(a)** Das großzellige astrozytäre Wachstumsmuster kann felderförmig sich abwechseln mit einem kleinzelligen oligodendrogliomatösen Wachstum. **(b)** Bei dem großzelligen Wachstum zeigen sich die Gliazellen vielfach in rythmischer Anordnung und auch perivaskulär, so dass das Bild von ependymomähnlichen Strukturen erscheint.

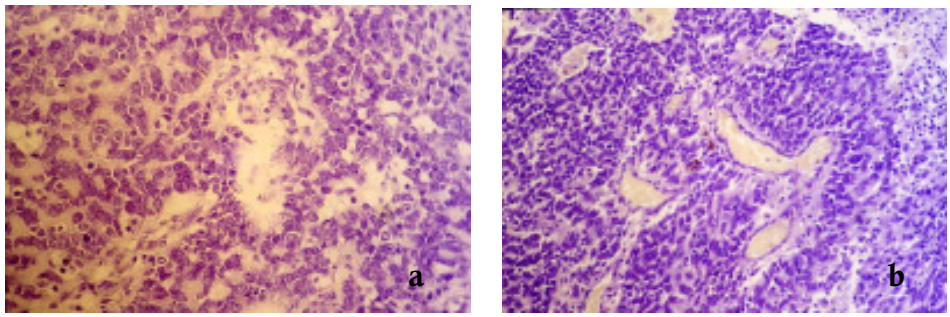


Abb. 3.14 a und b Bei genauer Betrachtung ergibt sich jedoch, dass es sich um die selben, meist großen und kleinen Zellen handelt wie in den diffusen Mischgliomen: **(a)** T 054/P 09 Objektiv-Vergrößerung x25. **(b)** T 791/P 05 Objektiv-Vergrößerung x25.

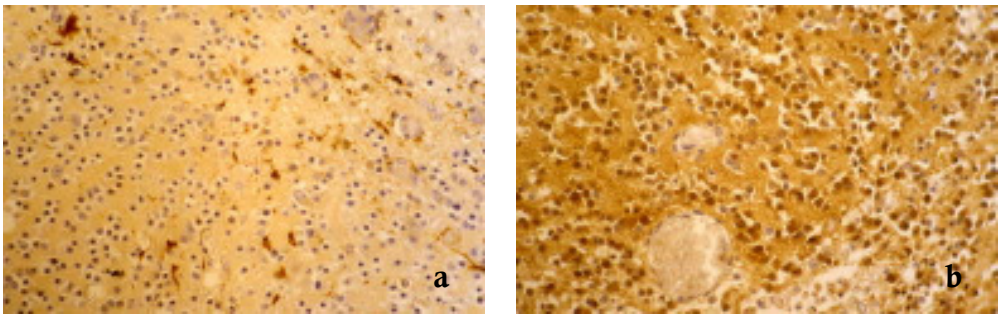


Abb. 3.15 a und b T 783/P 04 25 fache Vergrößerung: **(a)** GFAP-Expression bei oligodendrogliomatösen oder regressiv veränderten Wachstum ist nur geringgradig vorhanden. Man findet einzelne positive Zellen. **(b)** Dagegen ist S-100 in aller Regel im Tumor diffus positiv expremiert. Es finden sich eine zytoplasmatische Expression zwischen den Zellkernen.

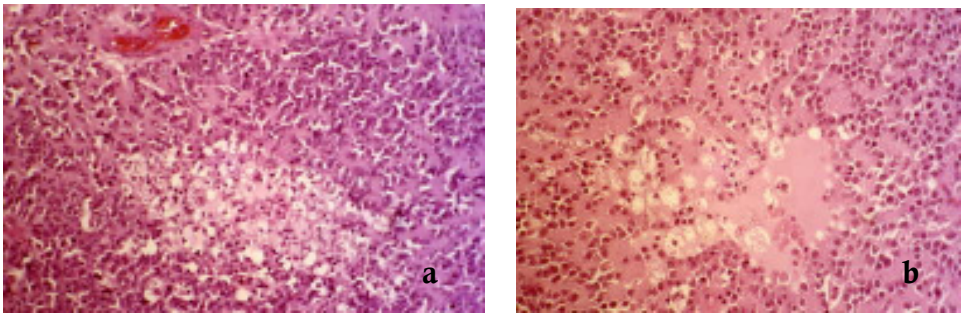


Abb. 3.16 **(a)** T 058/P 10 Vergrößerung x16 In einigen Fällen findet man eine dichtere Anfärbung des Grundgewebes mit saurem Gliafaserprotein. Innerhalb der dichten Zellansammlung zeigen sich einzelne kleine nekrobiotisch veränderte Herde, in denen Fettkörnchenzellen angesammelt sind. Es entwickelt sich hier eine kleine Koagulationsnekrose die **(b)** T 061/P 11 x25 bei stärkerer Resorption eine kleine landkartenartige geformte Zyste bildet.

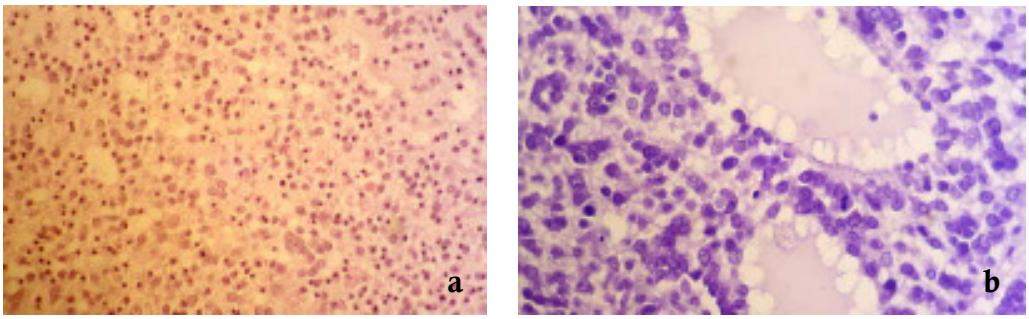


Abb. 3.17 **(a)** T 800/P 01 Objektiv-Vergrößerung 25 fach; Nekrobiotisch veränderte Partien in den ersten Passagen zeigen pyknotische Kerne, wobei ganze Felder nekrobiotisch verändert sind. **(b)** T 904/P 02 40 fache Vergrößerung; Im Kresylviolett bilden die regressiv veränderten Partien dann deutlich kleine Zysten, die Später konfluieren

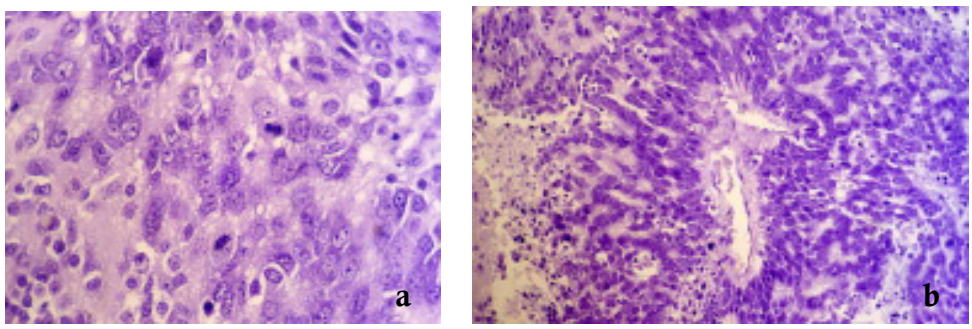


Abb. 3.18 **(a)** T 038/P 06 Objektiv-Vergrößerung x40 In den diffusen großzelligen Anteilen findet man eine reichliche Kernteilungstätigkeit. Die großen blasigen Zellkerne sind hier deutlich polymorph. **(b)** T 070/P 08 Objektiv-Vergrößerung x16 Das perivaskuläre Wachstum entsteht offenbar durch das beschleunigte Wachstum der Zellen, die dann hypoxisch werden und nur noch perivaskulär ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. Links unten beginnende Nekrosen.

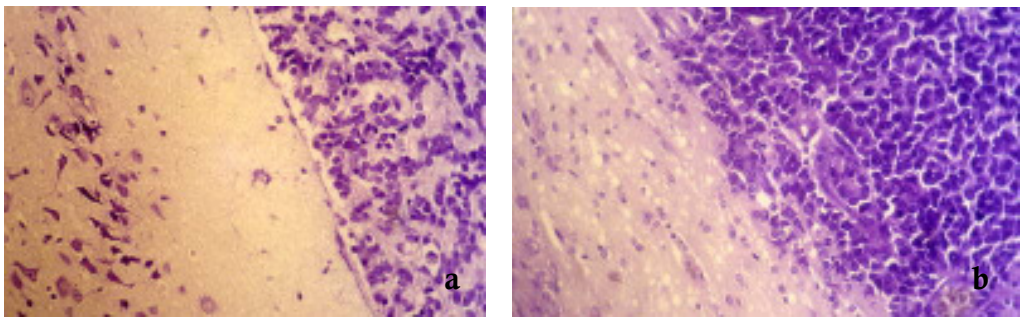


Abb. 3.19 **(a)** T 795/P 05 Objetiv-Vergrößerung x25 Intraventrikuläres Wachstum. Der Tumor respektiert hier das Ependym, das gegenüber dem Tumor eine Grenze bildet. Links unverändertes Gehirn. **(b)** T 064/P 12 Objektiv-Vergrößerung x25 Infiltrationszone eines Tumors gegenüber dem links bestehenden ödematös veränderten Hirn.

Die Induktionzeiten in der anfänglichen Phase waren sehr hoch Bei den mittleren Passagen war eine genaue Tendenz nicht auszumachen. Dafür variierten die Induktionszei-

ten zu stark. Erst zum Ende hin wurde der Abfall der Induktionszeiten deutlich und auch das histologische Bild begann sich zu verändern.

Die Tumoren der Passage 12 zeigten als histologische Morphologie ein eher monomorphes Zellbild. Die Einzelzellen lagen in Gruppen und Straßen oder Säulen; offenbar hatte eine Vereinheitlichung des Zellbildes stattgefunden (MENNEL u. SIMON, 1985). Kleine strichförmige Nekrosen, ähnlich denen der menschlichen Glioblastome, waren vorhanden.

3.3 Deskriptive morphologische Ergebnisse der bildgebenden Verfahren

3.3.1 MRT Aufnahmen

Die ersten MRT-Aufnahmen wurden bei den Nachkommen durchgeführt, die aufgrund der Pimärinduktion Hirntumoren entwickelten.

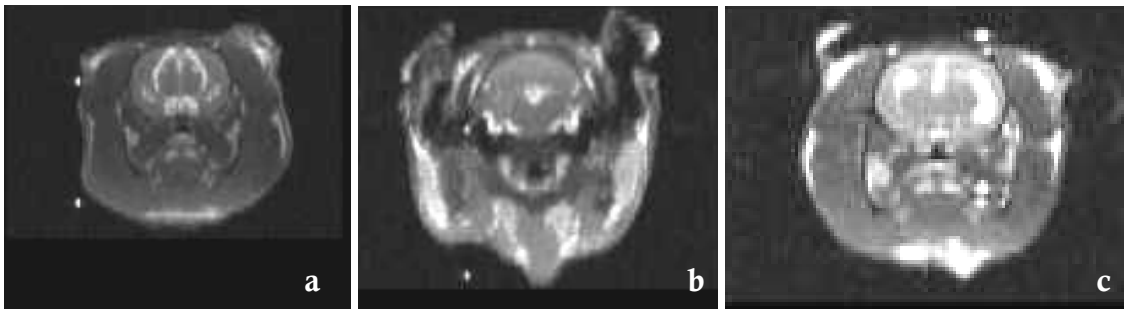


Abb. 3.20 Koronare 2,5 mm dicke T_2-gewichtete Kontrastaufnamen des Primärtumors T 873: **(a)** Kein Nachweis einer raumfordernden Läsion. Die Aufnahme erfolgte 108 Tage nach der Geburt und 95 Tage vor dem Tod des Tieres. (b) Auch nach 184 Tagen noch keine sichtbare tumoröse Läsion. (c) Nach 200 Tagen und 3 Tage vor dem Tod der Ratte deutlich sichtbar gestaute Seitenventrikel, die auf einen Tumor schließen lassen.

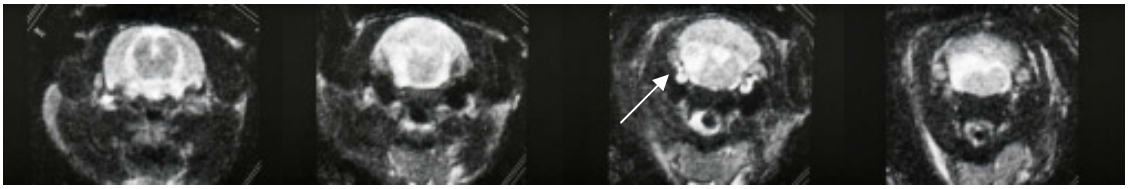


Abb. 3.21 Koronare 2,5 mm dicke T_2-gewichtete Kontrastaufnahmen vom Primärtumor T 873: Ebenfalls Aufnahmen getätigt 3 Tage vor dem Tod des Labortiers belegen die Vermutung eines Tumors.

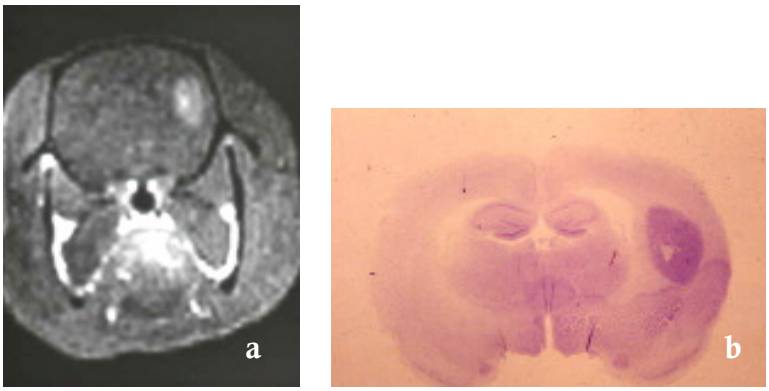


Abb. 3.22 **(a)** Koronare T_2-gewichtete Aufnahme des Primärtumors T 875 und **(b)** die Bestätigung durch das histologische Präparat.

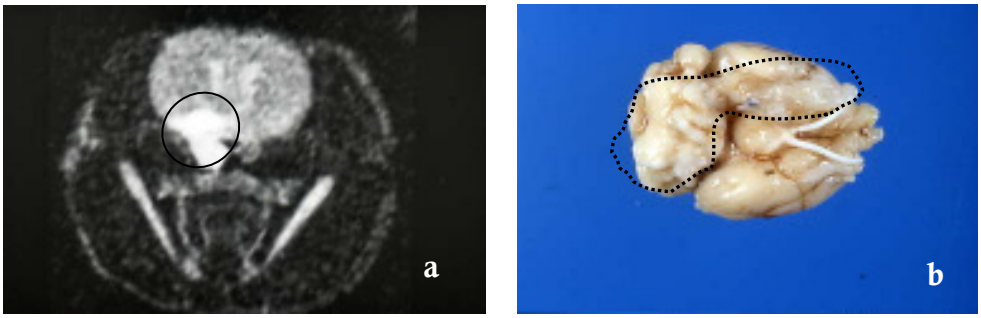
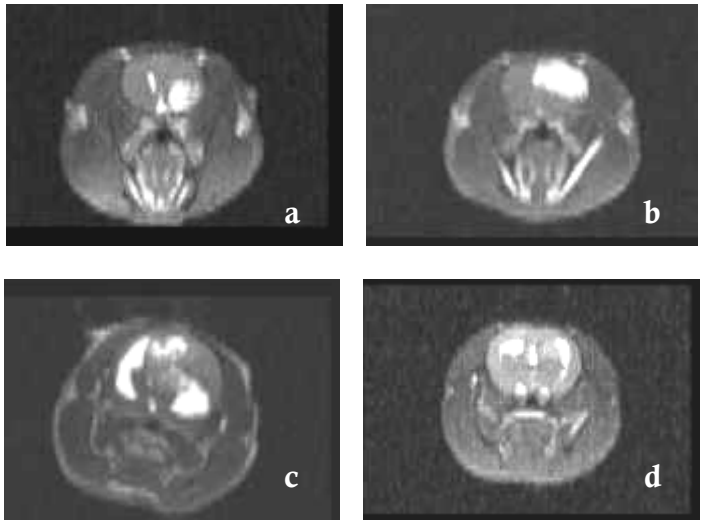


Abb. 3.23 Primärtumor T 874: **(a)** Koronarer Schnitt, pathologischer Befund, Schichtdicke 2,5mm, T_2-gewichtet. **(b)** Der Beweis durch das freigelegte Rattenhirn.

In den darauf folgenden zwölf Passagen erfolgte die Tumorerzeugung durch serielle Verimpfung wie unter 2.2.2 beschrieben. Als Versuchstiere wurden 56 isogenetische BD-IX Ratten verwendet, die randomisiert ausgewählt wurden.



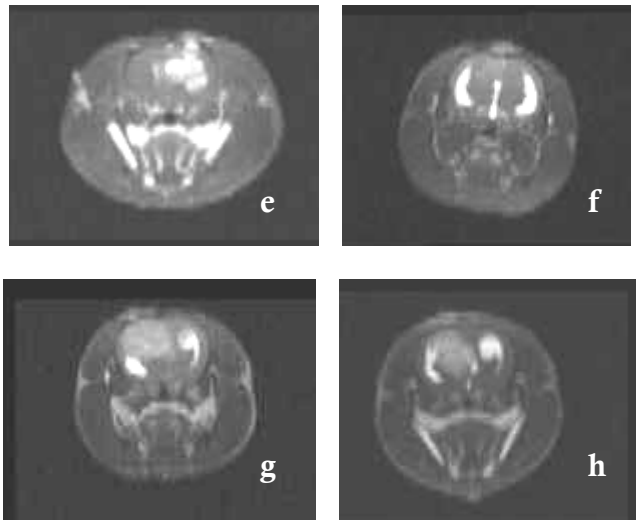


Abb. 3.24 Koronare 2,5 mm dicke T_2-gewichtete Aufnahmen nach Gadolinium-DTPA Gabe bei implantierten Transplantationstumoren, deren Ursprung sich in der rechten Hemisphäre befindet und die teilweise auch in die linke Hemisphäre einbrechen: **(a)** T 800/P 01. **(b)** T 904/P 02. **(c)** T 781/P 03. **(d)** T 794/P 05. **(e)** T 038/P 06**. (f)** T 070/P 08. **(g)** T 054/P 09. **(h)** T 061/P 11.

Alle Tiere wurden mit Ohrmarken gekennzeichnet und einzeln in Käfigen gehalten, die mit Registrierkarten für den Versuchsverlauf versehen waren.

Von den Versuchtieren in den Passagen eins bis zwölf, sowie den ersten vier Tieren der Primärindunktion wurden im Durchschnitt drei MRT-Aufnahmen angefertigt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Abstand zwischen letztem Aufnahmetag und Todestag möglichst gering blieb. Dies war wichtig um anschließend einen aussagekräftigen Vergleich zwischen MRT-Aufnahme und histologischen Schnitt schließen zu können. Im Durchschnitt betrug der Abstand zwischen allen zu letzt getätigten Aufnahmen und dem Todestag des Tieres 2,8 Tage (siehe Anhang MRT-Protokolle).

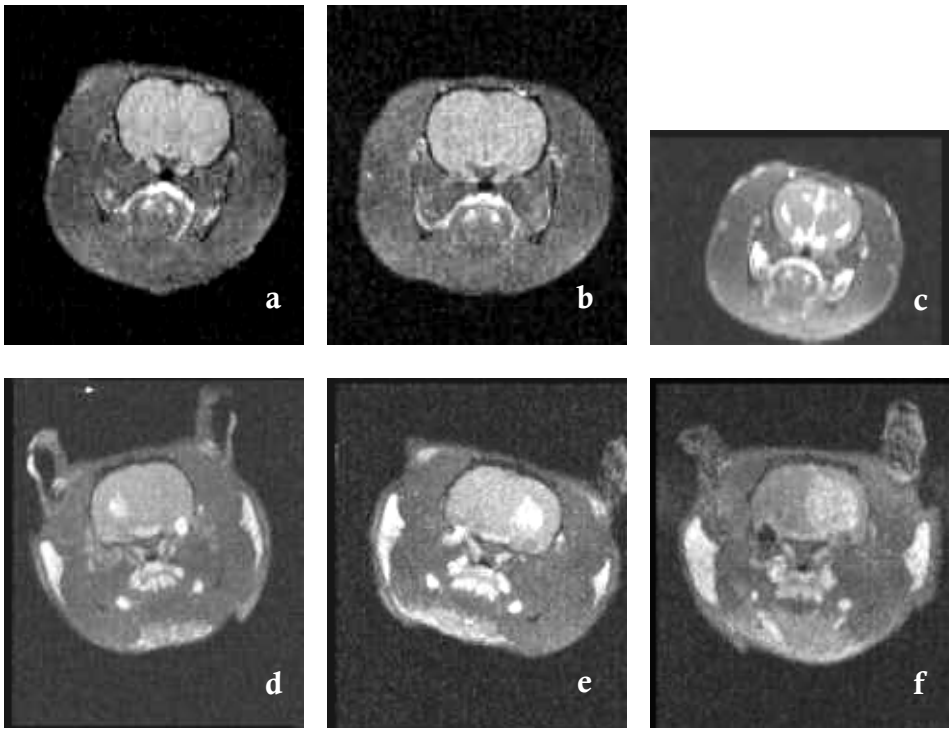


Abb. 3.25 Koronare 2,6 mm dicke, T_2-gewichtete Verlaufsaufnahmen des Tumors T 789/P 04 nach Gadolinium-DTPA Gabe: **(a)** Aufnahme 31 Tage nach Verimpfung und 38 Tage vor dem Tod des Tieres ohne Nachweis eines Tumors. **(b)** 7 Tage später keine Auffälligkeiten. **(c)** Auch nach weiteren 7 Tagen kein Tumorwachstum sichtbar. **(d)** 52 Tage nach der Verimpfung konnte erstmals ein Befund in der rechten Hirnhälfte nachgewiesen werden. **(e)** 6 Tage später deutliche Größenzunahme der Läsion. **(f)** Nach weiteren 8 Tagen füllt der Tumor die gesamte rechte Hemisphäre aus. Das Tier verstarb 3 Tage später.

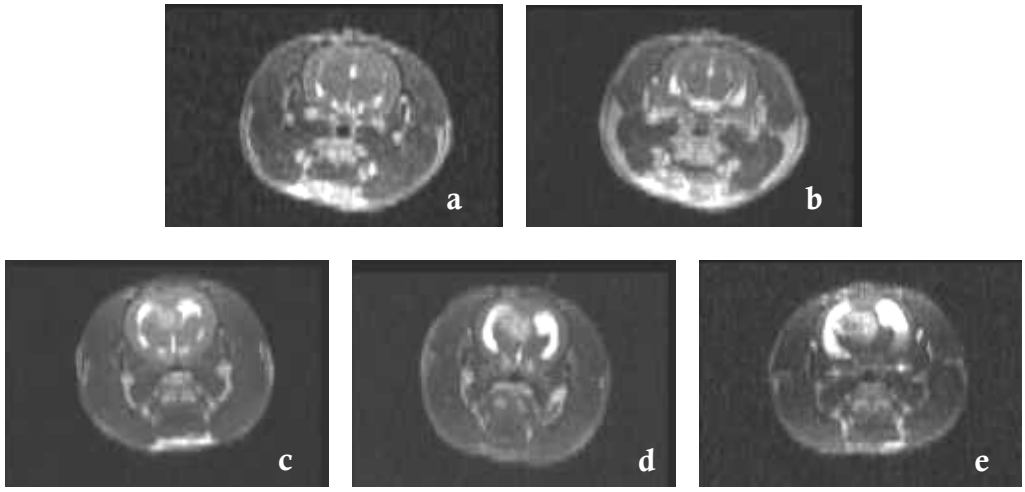


Abb. 3.26 Koronare Schnitte, Schichtdicke 2,6 mm, T_2-gewichtet vom Tumor T 064/P 12: **(a)** 13 Tage nach Verimpfung der Tumorzellen kein Nachweis eines Tumors. **(b)** Auch genau eine Woche später kein Wachstum sichtbar. **(c)** Nach weiteren 8 Tagen oder 28 Tage nach Verimpfung, eine schon deutlich zu erkennende Läsion in der rechten Hemisphäre. **(d)** 4 Tage später weitere Größenzunahme des Tumors erkennbar. **(e)** 1 Stunde vor dem Tod des Tieres und 4 Tage nach der letzten Aufnahme ist fast eine Verdopplung des Tumorumfangs, innerhalb von 8 Tagen, feststellbar.

3.3.2 Bearbeitete MRT-Aufnahmen mit Hilfe der IWT-Software

Anhand eines Primärtumors (873, siehe Abb. 3.2 u. Abb 3.20) und zwei Transplantationstumoren (789, siehe Abb. 3.7 u. Abb. 3.25 und. 064, siehe Abb. 3.26) werden die Bildtechnischen Möglichkeiten der IWT-Software aufgezeigt.

Bei der Bearbeitung der MRT-Aufnahmen mit dem Sotware-Assisteneten IWT, ist die richtige Markierung des Tumors, die Voraussetzung für eine einwandfreie Berechnung des Volumens. Aus diesem Grund ist es wichtig Personen zu betrauen, die in der Interpretation von MRT-Aufnahmen erfahren sind.

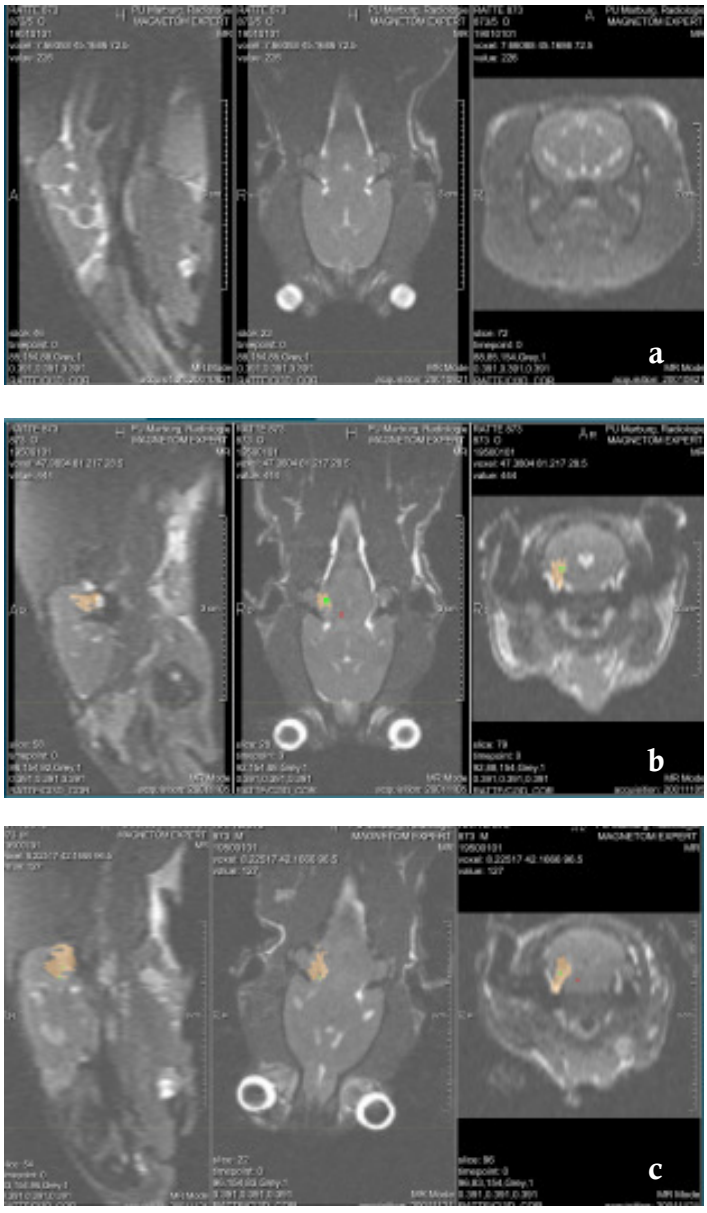
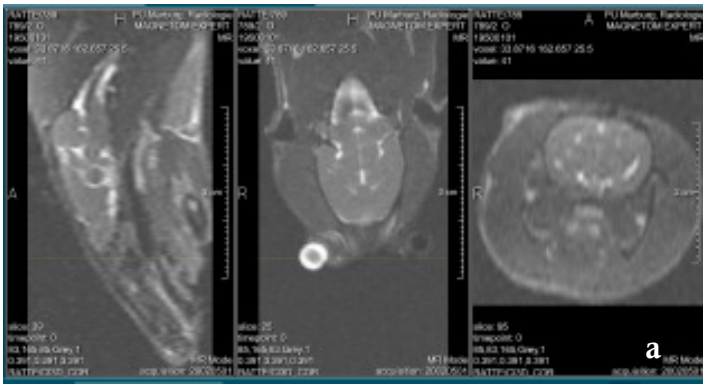
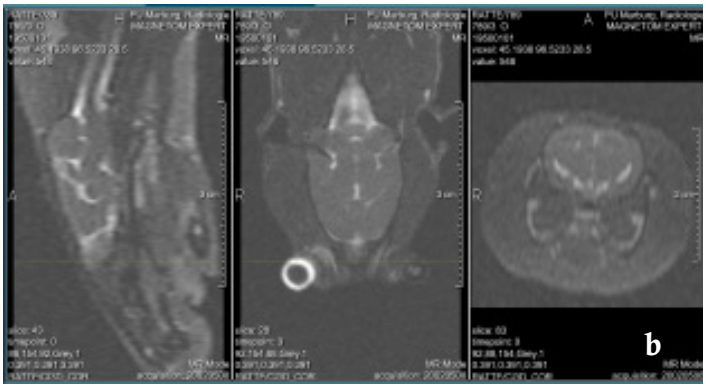
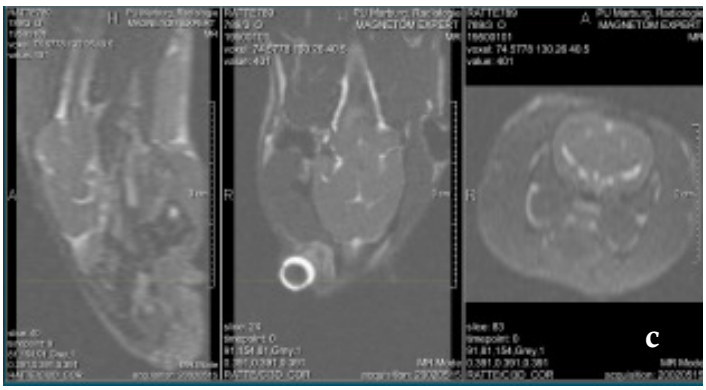
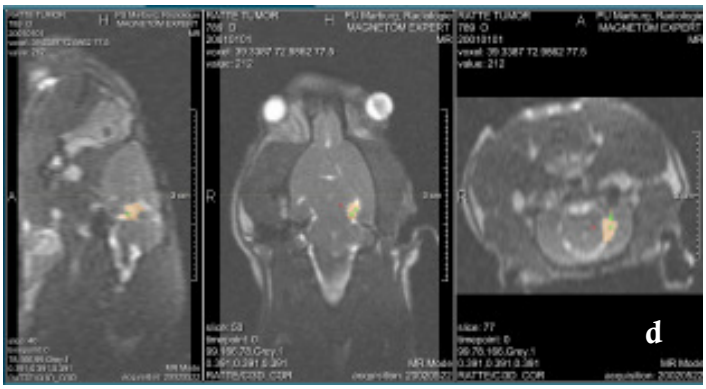


Abb. 3.27 Der Software-Assistent IWT konnte den Primärtumor T 873 in den drei Schichtaufnahmen (sagittal, transversal u. frontal) markieren und volumetrisch bestimmen. (a) Noch kein Nachweis einer raumfordernden Läsion. (b) 19 Tage vor dem Tod des Tieres betrug das Volumen 0,018 ml. (c) 16 Tage später stieg das Volumen auf 0,089 ml.


a


b


c


d

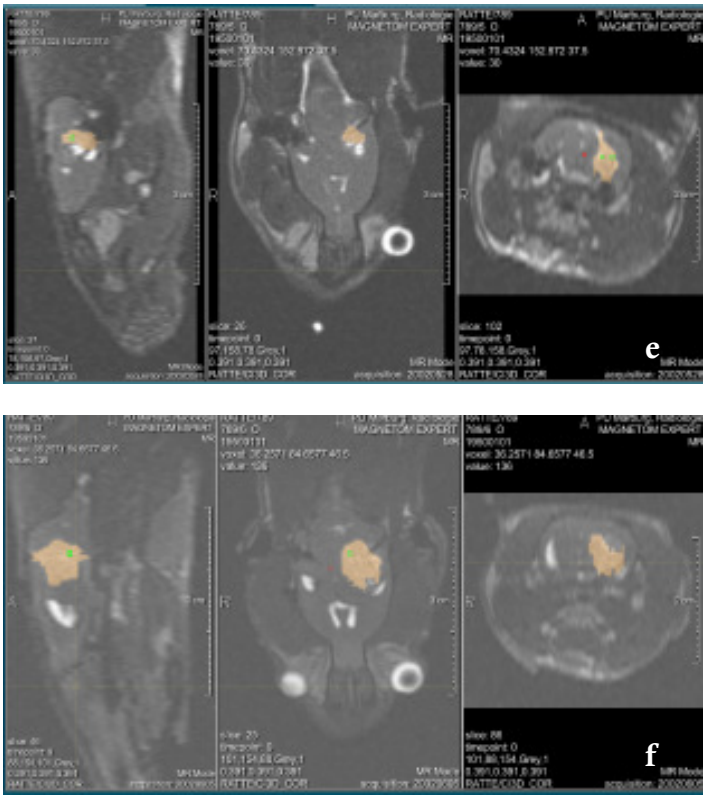
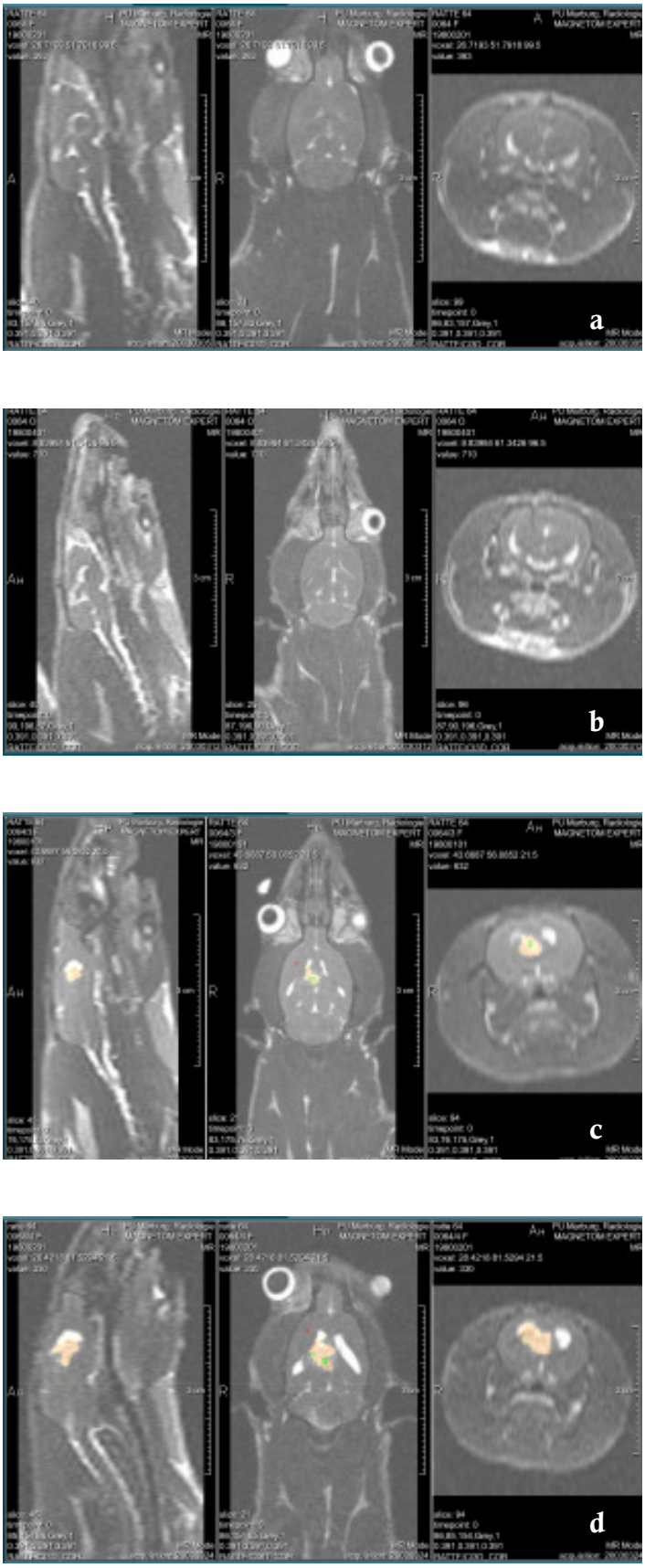


Abb. 3.28 Wachstumsverlauf des Transplantationstumors T 789/P 04. Markierund und volumetrische Berechnung erfolgte mit der IWT-Software. **(a)**, **(b)** u. **(c)** zeigen Aufnahmen, die 31, 38 u. 45 Tage nach Verimpfung der Tumorzellen entstanden. (d) Zu sehen ist der der makierte Tumor mit einem errechneten Volumen von 0,02 ml nach 52 Tagen**. (e)** 6 Tage später ist eine Volumenzunahme von 0,015ml auf 0,035 ml festzustellen. **(f)** Weitere 8 Tage später hat sich das Volumen mehr als verfünffacht und betrug 0,20 ml.


a
b
c
d

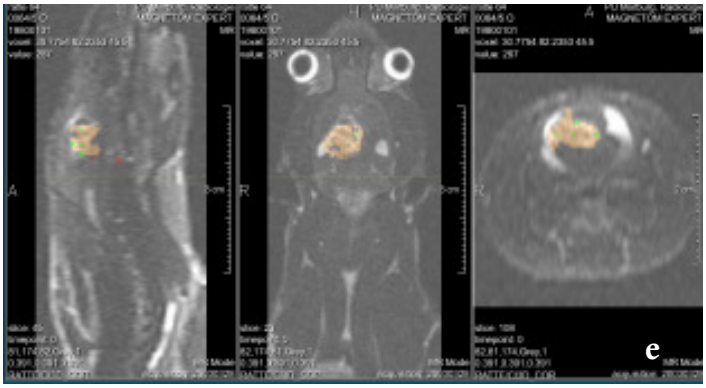


Abb. 3.29 Transplantationstumor T 064/P 12: **(a)** u. **(b)** 13 u. 20 Tage nach Verimpfung kein sichtbarer Nachweis eines Hirntumors**.(c)** 30 Tage nach Verimpfung konnte ein Tumor mit derm Volumen von 0,016 ml markiert werden**. (d)** 4 Tage später erhöhte sich das Volumen auf 0,057 ml. **(e)** Weitere 4 Tage später hat sich das Volumen fast verdreifacht auf 0,15 ml.

3.4 Quantitative Ergebnisse

3.4.1 Lichtmikroskopische Morphometrie

Es wurden von 34 Versuchstieren die Tumorgewebepräparate unter dem Lichtmikroskop vermessen. Die Vorgehensweise wurde schon im Abschnitt 2.2.10 eingehend erläutert. Die errechneten Volumina von Observer 1 und 2 sind im Anhang unter 7.1.2 einzusehen.

Folgende graphische Darstellungen sollen die Veränderlichkeit der errechneten Tumorvolumina zwischen den beiden Auswertern (Observer 1 u. 2) wiedergeben. Erstere Graphik zeigt anschaulich wie stark sich die Tumorvolumen beider Observer gleichen. Mit Hilfe der gestrichelten Linie, LoE (Line of Equality), die den Bereich der 100% Übereinstimmung markiert, lassen sich optisch, die Abweichungen zwischen den beiden Auswertern gut darstellen. Die zweite Graphik, das sogenannte Bland-Altman-Diagramm, bestätigt die geringe Interobservervariabilität. Eine gute Übereinstimmung der Messwerte ist besonders bei kleinen Volumina zu beobachten. Ab einer gemessenen Tumorgröße von ca. 0,1 ml wird die Übereinstimmung der Messwerte beider Observer schlechter.

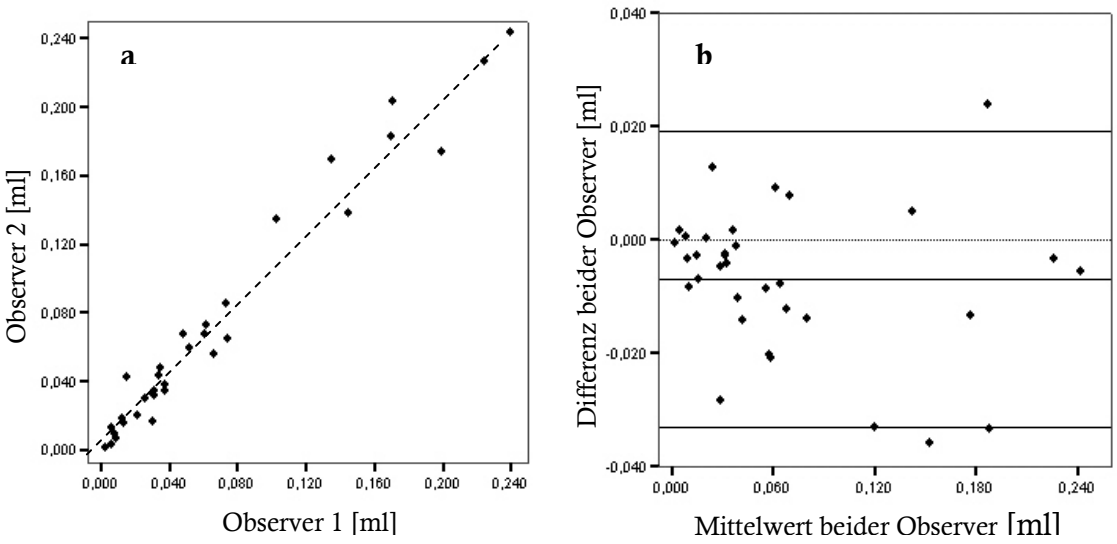


Abb. 3.30 **(a)** Gemessenes Tumorvolumen von Observer 1 u. 2 mit Hilfe der lichtmikroskopischen Morphometrie und die LoE. **(b)** Bland-Altman-Diagramm zur graphischen Darstellung der Differenz zwischen den beiden Observern, welche gegen den Mittelwert der beiden jeweiligen Messwerte aufgetragen werdeen.

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Differenz [ml]	34	-,036	,024	-,00671	,013053

Die niedrige Interobservervariabilität ist ein Indiz dafür, dass die angewandte Methode gut reproduzierbar und weitgehend frei von Einflüssen seitens des Observers ist.

Bedeutende Fehlerquellen morphometrischer Analysen sind nach OBERHOLZER (1983):

- Strukturartefakte
- Präparationsartefakte und
- Stichproben- und Berechnungsartefakte.

Eine bedeutsame Fehlerquelle für die in dieser Arbeit angewandte Methode stellt die Gewebeschrumpfung dar. Sie ist Folge von Fixierung, Dehydrierung und Einbettung und kann je nach Fixationsmittel und Gewebetyp zwischen 1% und 40% betragen (OBERHOLZER, 1983).

Aus diesem Grund wurden die erhobenen Volumina der lichtmikroskopischen Morphometrie mit einem Korrekturfaktor von 0,8 multipliziert. In der gegenwärtigen Literatur wird mit Korrekturfaktoren zwischen 0,7 bis 0,8 gearbeitet.

3.4.2 IWT

Zur computergestützten Hirntumorvermessung konnten nur solche MRT-Bilder verwendet werden, bei denen die CISS (T2-gewichtete 3D constructive interference of steady state Sequenz. TR:16.7ms; TE: 8.1ms FA: 70°; FOV: 100mm x 50mm; matrix: 256x128; Schichtdicke: 36mm; 40 slices; voxel size: 0.39x0.39x0.9mm^3; NEX: 1; Aufnahmezeit: 2min 52 s) oder DESS Sequenzen (eine 3D double echo in steady state Sequenz. TR: 26.8ms; TE: 9.0ms; FA: 40°; FOV: 80mm x 40mm; matrix: 256x128; Schichtdicke: 36mm; 40 slices; voxel size: 0.31x0.31x0.9mm^3; NEX: 1; Aufnahmezeit: 5min 30 s) angewandt wurden.

Da nur bei diesen zwei Aufnahmeverfahren eine befriedigende Markierung der Hirntumoren, mit Hilfe der IWT, möglich war.

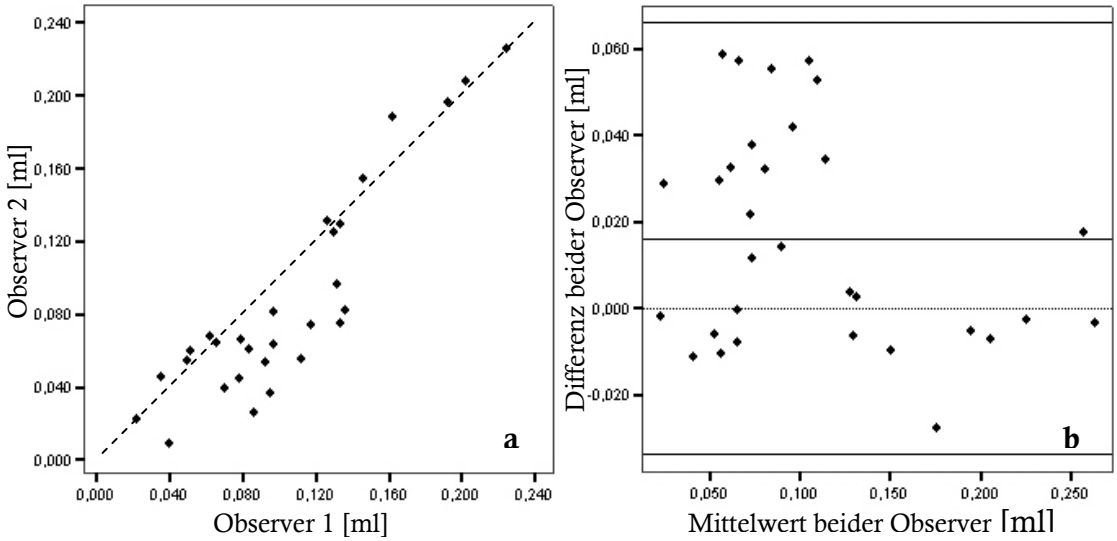


Abb. 3.31 (a) Darstellung der Interobservervariabilität der Tumorvolumina, bei der Messsequenz CISS u. der LoE. **(b)** Bland-Altman-Diagramm ebenfalls zur Darstellung des Übereinstimmungsgrades beider Observer.

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Differenz [ml]	31	-,027	,059	,01610	,024959

Beide Diagramme zeigen deutlich, dass die Interobservervariabilität der computergestützten Vermessung der Hirntumoren, bei der Messsequenz CISS, deutlich größer ist, als bei der Vermessung mit dem Lichtmikroskop.

Besonders bei kleinen Tumorvolumina gibt es eine große Abweichung unter den beiden Observern. Erst bei einer Tumorgröße von ca. 0,140 ml ist eine gute Übereinstimmung der gemessenen Tumorgröße unter Observer 1 und 2 auszumachen.

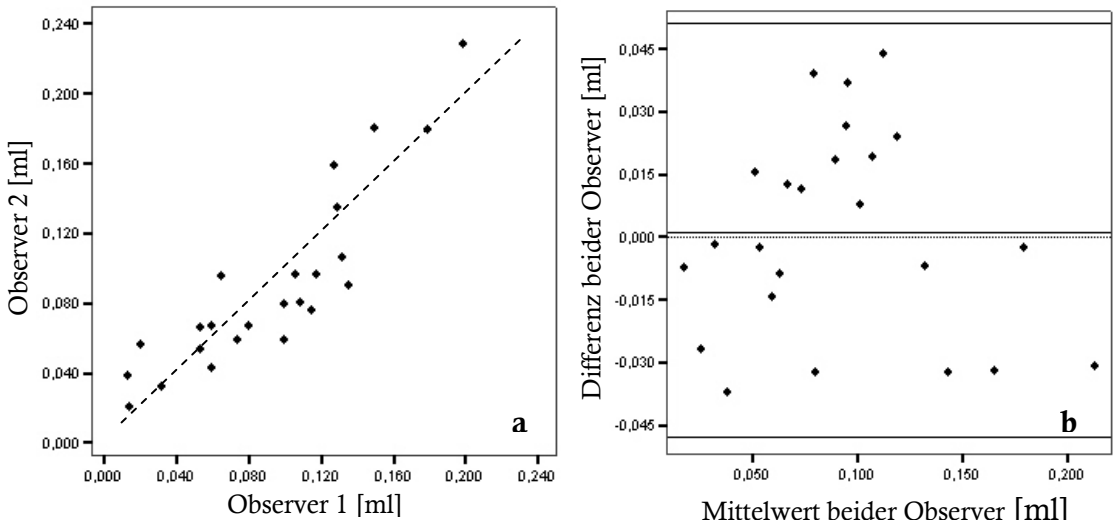


Abb. 3.32 **(a)** Diagramm zur graphischen Darstellung der Übereinstimmung von Tumorgrößen, gemessen von zwei unterschiedlichen Observern. Die Tumoren wurden diesmal mit der Messequenz DESS rekonstruiert.u. anschließend computergestützt vermessen. **(b)** Bland-Altman-Diagramm zur besseren graphischen Darstellung der absoluten intraindividuellen Differenzen zwischen Observer 1 u. 2.

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Differenz [ml]	24	-,037	,044	,00112	,024644

Auch bei der Messequenz DESS zeigt sich ein ähnliches Bild, wie bei der Auswertung der Interobservervariabilität der CISS Sequenz. Es kann ebenfalls beobachtet werden, dass sich die Volumendaten beider Auswerter bei größeren Tumoren stärker gleichen als bei kleineren Hirntumoren.

Somit ist festzustellen, dass die computergestützte Volumenmessung bei kleinen Tumoren eine größere Interobservervariabilität aufweist, als es bei größeren Hirngeschwülsten der Fall ist. Bei der, mit dem Lichtmikroskop unterstützten, Volumenmessung ist ein gegenteiliger Trend zu beobachten. Hier liegen die Volumenwerte von kleinen Hirntumoren, beider Observer, näher beieinander, als bei größeren Tumoren. Generell betrachtet, ist jedoch die Interobservervariabilität der lichtmikroskopischen Morphometrie besser, als die der computergestützten Morphometrie.

3.4.3 Vergleich beider Methoden

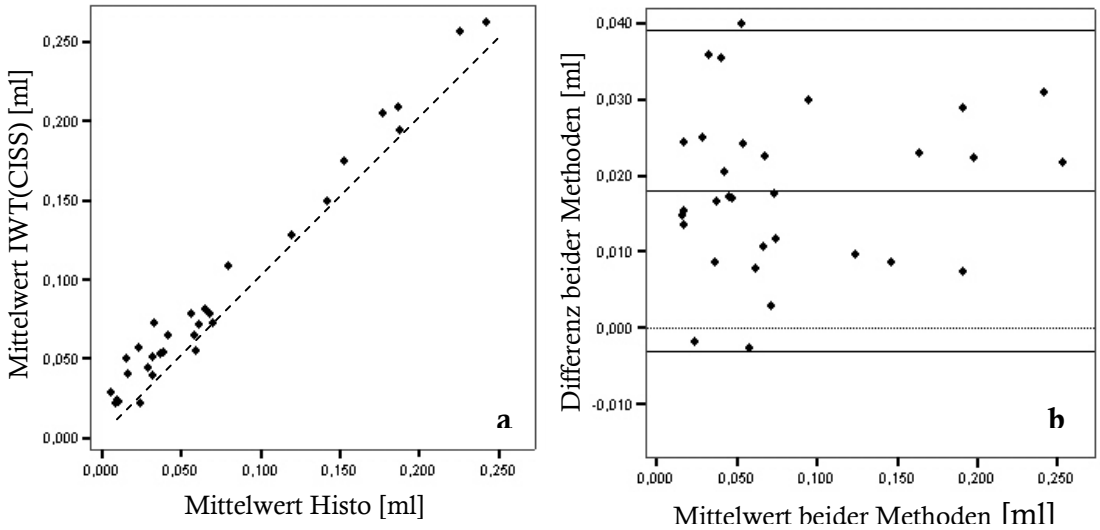


Abb. 3.33 (a) Bei diesem Diagramm ist der Mittelwert aus den gemessenen Volumendaten beider Observer, der CISS Sequenz, gegen den Mittelwert der Volumendaten, beider Observer, aus der lichtmikroskopischen Vermessung aufgetragen. **(b)** Bland-Altman-Diagramm zur besseren graphischen Darstellung der absoluten intraindividuellen Differenz zwischen IWT bearbeiteter CISS Sequenz und der lichtmikroskopischen Morphometrie.

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Differenz IWT (CISS)/Histo [ml]	31	-,005	,075	,03285	,024254

Anhand der beiden oberen Diagramme ist sehr gut zu erkennen, dass die mit Hilfe der IWT-Software vermessenen Tumoren, der CISS Sequenz, bis auf zwei Ausnahmen, deutlich größer gemessen wurden. Eine Annäherung an den Goldstandart (mikroskopische Morphometrie), gelingt auch nicht überzeugend bei größeren Tumorvolumina, jedoch ist die Diskrepanz beider Methoden bei kleineren Tumoren größer.

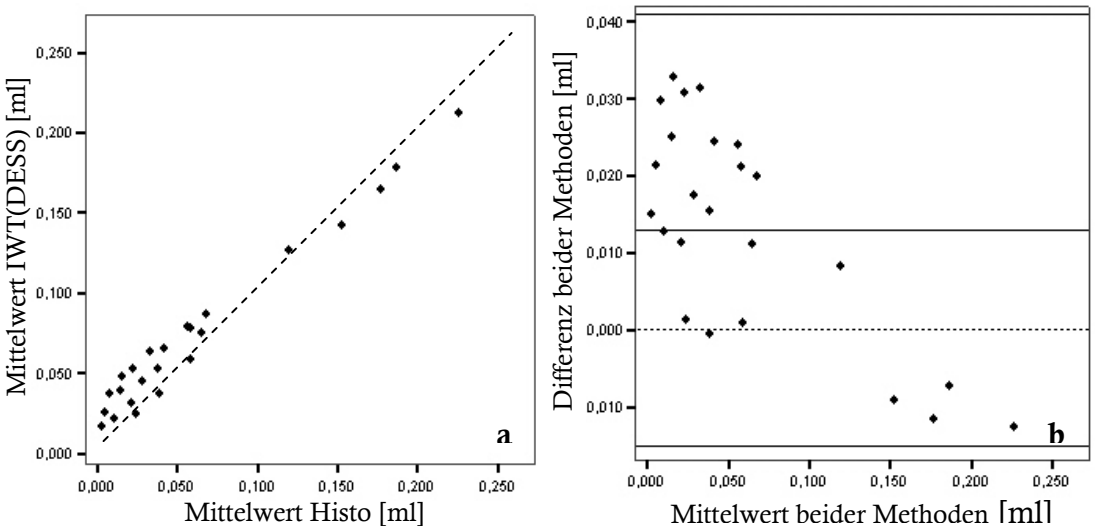


Abb. 3.34 **(a)** In diesem Diagramm sind die Mittelwerte beider Observer der beide Methoden, gegeneinander aufgetragen. Gestrichelte Linie: Line of Equality. **(b)** Bland-Altman-Diagramm zur Darstellung der Differenz zwischen den beiden Methoden, welche gegen den Mittelwert der beiden Methoden aufgetragen wird. Durchgezogene Linie: mediane Differenz und 95%-Übereinstimmungsbereich. Gestrichelte Linie: Abweichung vom Nullwert (Bias).

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Differenz IWT (DESS)/Histo [ml]	24	-,012	,091	,03007	,031129

Auch in der DESS Sequenz ist die Tendenz der Überbewertung, d.h. die IWT-Sofware misst die Tumoren im Vergleich zur lichtmikroskpischen Morphometrie zu groß. Dies gilt besonders für die kleinen Tumoren. Ab einer Tumorgröße von mehr als 0.140 ml kommt es zu einer Unterbewertung aber auch gleichzeitig deutlichen Annährung der Volumenwerte beider Methoden. Hierbei lässt sich auf einen Übereinstimmungseffekt schließen, der abhängig von der Größe des gemessenen Volumens ist.

Generell ist eine Tendenz der Übereinstimmung beider Methoden zu erkennen, die unter der Verwendung eines kleineren Korrekturfaktors noch wesentlich deutlicher wird. Die vorliegenden Ergebnisse bieten ausreichenden Ansatz für weitere Untersuchungen.

4 Diskussion

4.1 Allgemeines

Die Möglichkeit der In-vivo-Bildgebung bei kleinen Versuchstieren in einem Ganzkörper-Kernspintomographen war bis vor kurzem noch nicht gegeben. Daher gestaltete sich die Beurteilung des Wachstumsverhaltens und der Wachstumscharakteristik intrazerebral verimpfter Hirngeschwülste, z. B. während einer Behandlung, als besonders schwierig. Zwar wurden diese Tumoren in der Vergangenheit oft mit den unterschiedlichsten Methoden untersucht, nicht zuletzt neuroradiologisch, jedoch setzten diese Methoden in der Regel die Tötung der Tiere voraus.

Die Einführung moderner bildgebender Verfahren und die Möglichkeit ihrer Anwendung auf kleine Versuchstiere erlaubt nun die Untersuchung des Wachstumsverhaltens solcher Tumore in vivo in kurz aufeinander folgenden Abständen. Damit ist es möglich, das Wachstum der Tumoren unter unbeeinflussten Bedingungen und im Rahmen therapeutischer Protokolle direkt zu verfolgen sowie die Anzahl der zu tötenden Versuchstiere klein zu halten.

4.2 Verlaufsuntersuchungen

4.2.1 Vorausgegangene Untersuchungen am Rattenhirn

Verlaufsuntersuchungen bei experimentell erzeugten zerebralen Erkrankungen am Rattenhirn sind Gegenstand mehrerer Publikationen, bei denen MR-Geräte mit kleinen Magnetöffnungen Verwendung fanden (KING et al, 1991; RUDIN et al, 1991; TING et al, 1992). Andere Autoren verwendeten klinisch benutzte Ganzkörpersysteme auch für die Bildgebung an kleinen Versuchstieren (MARTOS et al, 1993).

MARTOS et al (1993) verwendete ebenfalls einen Ganzkörper-Kernspintomographen mit neu entwickelter Hardware. Sie bestand aus speziellen Sende- und Empfängerspulen. Mit Hilfe dieser Änderungen gelang es, auch feinere Strukturen des Rattenhirns bei Untersuchungen in einem Ganzkörper-MR-Tomographen darzustellen, ohne weitere Veränderungen der Hardware vornehmen zu müssen.

4.2.2 Vergleich mit den eigenen Resultaten

In der vorliegenden Arbeit, wurde einerseits die Darstellbarkeit experimentell erzeugter Tumoren des Rattenhirns und andererseits die Möglichkeit ihrer volumetrischen Be-

rechnung untersucht. Die Verwendung eines 1.0-Tesla-Ganzkörper-Kernspintomographen demonstriert eine leicht zugängliche Methode für in-vivo-Untersuchungen am Rattenhirn.

Die Verbesserung der Hardware gegenüber dem kommerziellen erhältlichen System bestand ausschließlich in der Anfertigung von mehreren speziellen Volumenspulen. Ein klinischer Ganzkörper MR-Scanner ist nur mittels geeigneter Hardwaremodifikationen in der Lage, kleine Volumina, wie z.B. Ratten oder Mäuse, in hoher Bildqualität zu erfassen. Deshalb wurden für dieses Forschungsvorhaben spezielle, dezidierte Kleintierempfangsspulen entwickelt und implementiert.

Es zeigte sich, dass wesentliche Abschnitte des Rattenhirns auf den erhaltenen MR-Aufnahmen auch bei relativ großen Schichtdicken von 2 bis 3 mm gut abzugrenzen sind. T_2-gewichtete Bilder mit hohem Weichteilkontrast zwischen weißer und grauer Substanz erfordern allerdings lange Messzeiten. Sofern T2-gewichtete Bilder von hoher Qualität notwendig sind, muß die angewandte Narkosetechnik Untersuchungszeiten von 1 bis 2 Stunden ohne erhöhte Komplikationsrate erlauben. Die hier angewandte Narkoseform ist ohne großen technischen Aufwand durchführbar, komplikationsarm und von Narkosedauer und Tiefe vollkommend ausreichend.

MR-Aufnahmen unterscheiden sich im Vergleich zu histologischen Schnitten erheblich im Hinblick auf Schichtdicke, so dass daraus Schwierigkeiten resultieren können, kleine Details auf MR-Aufnahmen entsprechend Zeichnungen aus histologischen Atlanten zuzuordnen. Einige Strukturen des Rattenhirns, die schräg zur verwendeten Schichtebene verlaufen, zeigen auf MR-Bildern eine andere Konfiguration als auf üblichen histologischen Schnitten oder können durch den Partialvolumeneffekt sogar verschwinden. So erscheinen die Seitenventrikel beispielsweise auf koronaren MR-Bildern bogenförmig, was in Atlaszeichnungen nicht nachvollziehbar ist.

Auch die Capsula interna ist auf T2- gewichteten, 2,5 mm dicken Schichten nur unscharf abgrenzbar oder völlig unsichtbar. Im Bereich der des basalen Kortex führen die lufthaltigen Felsenbeine zu Suszeptibilitätsartefakten. So wird die Beurteilung etwa der Region der Amygdala, der Area enthorhinalis und des Cortex perirhinalis erschwert.

Gadolinium-DTPA-unterstützte MR-Untersuchungen haben sich für die Visualisierung von Blut-Hirn-Schrankenstörungen und Blut-Liquor-Schrankenstörungen in vivo bereits bewährt. RUNGE et al. (1988 u. 1991) berichteten über MR-Untersuchungen nach Implantation von Gliomzellen, um die Eigenschaften verschiedener gadoliniumhaltiger

Kontrastmittel zu untersuchen. In unserem Tumormodell zeigten die verimpften Tumoren deutliches Enhancement nach i.p. Gadolinium-DTPA-Applikation in einer Konzentration von 0,5 mmol/kg Körpergewicht. Diese relativ hohe Dosis von Kontrastmittel wurde ohne Komplikationen von den Labortieren vertragen.

Bei dem intraparenchymalen Gliommodell ist die Blut-Hirn-Schranke offen. Aus diesem Grund sind die tumorösen Läsionen bei diesem Tumormodell nach Bolusinjektion von Gadolinium-DTPA hervorragend und in guter Korrelation mit den histologischen Befunden abbildbar. Es ist eindeutig festzustellen, dass in-vivo-Untersuchungen zur Verlaufskontrolle experimentell erzeugter Hirntumoren mit Störungen der Blut-Hirn-Schranke und Gadolinium-DTPA-unterstützter MR-Tomographie, erfolgreich durchzuführen sind.

4.3 Morphologische Befunde

4.3.1 Morphologie der ersten zwölf Passagen

In diesem Abschnitt sollen die morphologischen Veränderungen, die bei der Etablierung einer Transplantationstumorlinie, deren Primärtumor ein transplazentar induzierter Hirntumor ist, dargestellt werden.

Über die histogenetische Ableitung und ihre Konsequenzen für die Vergleichbarkeit mit menschlichen gliösen Neoplasien verschafft MENNEL (1980, 1988) einen guten Überblick.

Die Veränderungen in den ersten Passagen permanenter Transplantationstumorlinien sind gut reproduzierbar (MENNEL, 1980). Die Entwicklung der Linie G-XIX ist daher repräsentativ für das Ratten-Gliom-Modell.

In den ersten Generationen etwa bis zur 6. Passage behielt der Tumor das histologische Bild des induzierten Primärtumors bei (MENNEL, 1982). Bis zur 12. Passage trat eine morphologische Vereinheitlichung auf (MENNEL und SIMON, 1985). Die Tumoren waren nun als niederdifferenzierte Gliome einzustufen.

Mir dieser allmählichen Enddifferenzierung trat die schon angesprochenen Verkürzung der durchschnittlichen Induktionszeit von anfänglich ca. 70 Tagen auf 30 Tage ein (MENNEL, 1988).

In den ersten Passagen wuchsen die Tumoren lokalisiert in der weißen Substanz der Hemisphäre. Mit Nivellierung des morphologischen Bildes zeigten sie ein zunehmend

aggressiveres Wachstum, hielten sich jedoch im Wesentlichen an die anatomischen Wachstumsgrenzen (MENNEL et al, 1986).

4.3.2 Morphologie höherer Passagen

Da die Transplantationstumorlinie G-XIX nach der 12. Passage beendet wurde, können morphologische Ergebnisse höherer Passagen nicht diskutiert werden. Doch bieten vorangegangene Arbeiten (MENNEL, 1980 u. 1984; HELLWIG 1984)) einen Einblick über mögliche Entwicklungen. In diesen beschreibt Mennel (1980) Tumoren zwischen der 12. und 15. Passage. Diese Tumorgeneration zeigt ein sehr einheitliches Zellbild, ähnlich eines niedrig differenzierten Glioms.

Schlegel (1990) berichtet, dass es in seiner verwendeten Tumorlinie G-XIII ab der 25. Passage es zu einem diffusen Wachstum kam. Der Tumor hielt sich nicht mehr an vorgegebene Grenzen. Des Weiteren kam es auch zu einer erneuten Verkürzung der durchschnittlichen Induktionszeit auf 15-20 Tage.

4.3.3 Transplantationstechnik

Bei der Beurteilung des Wachstumsverhaltens nimmt die Transplantationstechnik den wohl größten Einfluß und ist aus diesem Grund zu berücksichtigen. Grundsätzlich stehen für das Ratten-Gliom-Modell die Methoden der Frei-Hand-Implantation und der stereotaktischen Implantation zur Verfügung (RAMA et al., 1986).

Die Frei-Hand-Methode bietet den Vorteil, vitales Zellmaterial in kurzer Zeit auf eine relative große Anzahl von Versuchstieren verimpfen zu können. Der wesentliche Nachteil bei dieser Methode liegt bei der Tumorzell-Aussat.

Da bei diesem Verfahren größere Kanülen verwendet werden müssen um die Schädeldecke des Versuchstieres zu überwinden, entsteht ein viel größerer Einstichkanal, der den Reflux von Tumorzellen fördert (RAMA et al., 1986). Auch ist eine exakte vorgegebene Eindringtiefe durch Frei-Hand-Verimpfung nur schwer einzuhalten.

Die bestehenden Probleme dieser Applikationsform haben dazu geführt, dass sich die stereotaktische Transplantationsmethode zunehmend durchgesetzt hat (KOBAYASHI et al., 1980; RAMA et al., 1986). Die Vermeidung von größeren Kanülen durch Bohrlöcher, das Verhindern eines hohen Druckes durch die Möglichkeit einer langsameren Verimpfung und die Reduktion des Inokulationstraumas scheinen bei technisch korrekter Ausführung ein lokalisiertes Tumorwachstum zu fördern.

Der Nachteil der Stereotaxie ist der größere zeitliche Aufwand und die damit verbundene begrenzte Anzahl an Untersuchungseinheiten.

4.4 Die Methode der lichtmikroskopischen Morphometrie

Im Methodenteil wurde eingehend auf die Vorgehensweise der stereologischen Meßmethode eingegangen. Nun soll eine kritische Analyse der möglichen Fehlerquellen folgen, da sie den Wert einer jeden morphometrischen Untersuchung ausmacht.

Eine für alle Messverfahren bedeutsame Fehlerquelle stellt die Gewebepräparation dar. Zum einen ist die Gewebeschrumpfung zu nennen, die einen großen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Arbeit nimmt. Wie schon erwähnt, ist sie Folge von Fixierung, Dehydrierung und Einbettung und kann je nach Fixationsmittel und Gewebetyp zwischen 1% und 40% betragen (OBERHOLZER, 1983).

Für die ermittelten Volumenwerte der lichtmikroskopischen Analyse wurde ein Korrekturfaktor von 0,8 angesetzt. Dieser berücksichtigt die größtmöglichste Abweichung vom Präfixationszustand. Bei Verwendung von kleineren Korrekturfaktoren ist zwar davon auszugehen, dass sich eine deutlich bessere Übereinstimmung der beiden verglichenen Methoden einstellt. Es kann jedoch gleichsam nicht ausgeschlossen werden, dass eine Schönung der mit dem Lichtmikroskop gewonnenen Daten, stattfindet.

Als weitere Präparationsartefakte sind die Kompression durch Schneiden (LOUD, 1984), die richtige Vergrößerung (UNTERWOOD, 1970), der Entfaltungsgrad, sowie die Lage der Schnittebene (OBERHOLZER, 1983) zu nennen. Nach Paumgartner et al. (1981) können die dadurch verursachten Messfehler bis zu 300% betragen.

Abschließend ist auf Artefakte durch inkorrekte Berechnungsmethoden hinzuweisen. So ist die stereologische Bestimmung von geometrisch einfachen Objekten wesentlich genauer durchführbar. Somit ist z. B. die Bestimmung des Volumens eines Zellkerns, der doch in seiner Form einem Kreis oder einer Ellipse ähnelt, einfacher, als die Volumenberechnung eines Tumors mit einer unregelmäßigen Begrenzung. In solchen Fällen muss dann immer individuell entschieden werden, wie mathematisch vorgegangen werden sollte, um die bestmögliche Annäherung an die Realität zu erlangen.

In dieser Arbeit wurden, wie schon beschrieben, die Tumoren mit einem Ellipsoid gleichgesetzt. Auch wenn diese geometrische Figur nicht jedem der 35 Tumoren gerecht wird, so ist doch damit die bestmögliche Annäherung an die tatsächlichen Verhältnisse gegeben.

Die Untersuchung der Interobservervariabilität zeigt, dass trotz zweier, unabhängiger Auswerter, die Volumenmesswerte konstant blieben und es sich keine zu beanstandende Differenz zwischen beiden Observern ergab. Damit ist die Methode, von Seiten des Auswerters, störanfallsarm. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass mit der Präparatfärbung eine eindeutige Kennzeichnung der Tumoren möglich ist, da die Färbung keinen Spielraum für subjektiv festgelegte Tumorgrenzen lässt.

4.5 Die Methode der vollautomatischen Bildanalyse (IWT)

Für die vollautomatische Bildanalyse stehen heute leistungsfähige Rechner zur Verfügung, deren Vorteil in der PC-typischen Benutzerfreundlichkeit, den vergleichsweise geringen Anschaffungskosten und vor allem in einer erheblichen vereinfachten Datenverarbeitung liegt. Erhebung, Auswertung und Ergebnisdarstellung werden in ein und demselben System durchgeführt, wobei vorhandene PC-Software (ILAB 4, mevis Germany) genutzt werden kann.

Zwar wird die Auswertung der erhobenen Daten durch die oben genannten Vorteile, die ein solches System mit sich bringt, erheblich vereinfacht und dadurch auch weniger anfällig für Auswertungsfehler. So ist jedoch die Genauigkeit eines solchen Verfahrens, besonders das in dieser Arbeit verwendete, abhängig von der Qualität des auszuwertenden Bildmaterials und der Kompetenz desjenigen, der anhand der Aufnahmen die tumorösen Strukturen markiert.

Die Interobservervariabilität der computergestützten Morphometrie bestätigt diese Beobachtung. Im Vergleich zur Interobservervariabilität der mikroskopischen Morphometrie, bei der die Anzahl an größeren Abweichungen zwischen den einzelnen Werten beider Observer eher gering war, konnte eine ähnlich gute Übereinstimmung bei der computergestützten Volumenmessung nicht beobachtet werden.

Diese Tatsache macht deutlich, dass ein erhöhter Interpretationsspielraum im Bezug auf das Markieren der Tumoren vorliegt, der die beobachteten Abweichungen beider Auswerter erklärt.

Die Gründe dafür sind zum einen die schon erwähnte Qualität des Bildmaterials. Diese sollte so gut wie möglich sein, da mit steigender Schärfe der Bilder, die Begrenzung der Tumoren exakter vorgenommen werden kann. So ist damit zu rechnen, dass mit MR-Tomographen, deren Magnetfeldstärke die 1.0 Tesal deutlich überschreiten, bessere Ergebnisse zu erzielen sind. Wünschenswert wären Aufnahmen mit extra für Labortiere

konzipiertem MR-Tomographen. Deren magnetische Induktionswerte weit höher liegen dürfen, als die für den klinischen Gebrauch genutzten Apparaturen, die einen Wert von 3.0 Tesla aus Sicherheitsgründen nicht überschreiten.

Ein weiterer wichtiger Punkt zur optimalen Darstellung der Tumoren ist die Kontrastmittelanreicherung. In dieser Arbeit wurde auf einer i.v. Applikation des Kontrastmittels Zugunsten der Versuchstiere verzichtet und stattdessen das Kontrastmittel i.p. verabreicht. Ein besseres Anfluten des Kontrastmittels durch eine i.v Gabe, bei den Hirngeschwülsten ist anzunehmen. Doch ist darauf aufmerksam zu machen, dass bei weit fortgeschrittenen Tumoren eine intravenöse Gabe von Gadolinium-DTPA und dessen Anreicherung im Tumorgewebe ebenfalls deutlich erschwert ist, aufgrund des stark erhöhten intrazerebralen Drucks.

Rauschfreie Bilder und eindeutig markierte Tumoren durch Kontrastmittel sind unerlässliche Voraussetzungen für deren exakte Begrenzung. Sie bildet die Rechengrundlage der computergestützten Volumetrie und nimmt somit Einfluss auf das errechnete Volumen.

Durch eindeutige Unterscheidung zwischen tumorösen und nicht tumorösen Gewebe mit den oben genannten Mitteln ist das Verfahren weitgehend unabhängig von der Erfahrenheit der Person, die das Bildmaterial auswertet. Somit ist bei steigender Qualität der MRT Aufnahmen mit einer Verbesserung der Interobservervariabilität zu rechnen.

4.6 Eignung des verwendeten Tumormodells

Die Eignung des Modells wird von zwei Faktoren bestimmt:

1. Sind die gewonnenen Resultate auf die Verhältnisse beim Menschen übertragbar?
2. Sind die erhobenen Daten reproduzierbar?

Entscheidend für die Übertragbarkeit experimenteller Ergebnisse ist das Maß an Ähnlichkeit zwischen Original und Modell. Einen guten Überblick über die modelltheoretischen Aspekte experimenteller Tumoren in der Neuroonkologie verschafft MENNEL (1980).

Das zweite Kriterium zur Beurteilung des Modells, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, kann ebenfalls als erfüllt angesehen werden.

Das makroskopische, wie auch mikroskopisch Wachstumsverhalten, der zwölf Passagen aus der Tumorlinie G-XIX, weicht nicht von den vorausgegangenen Transplantationstumorlinien ab und bestätigt somit die Reproduzierbarkeit und damit die sehr gute Eignung dieses Tumormodells für die Experimentelle Neuroonkologie.

Die verglichenen Messdaten, der verschiedenen Auswertungspersonen, ähnelten sich sowohl bei der lichtmikroskopischen Morphometrie, als auch bei der Volumenbestimmung der Tumoren, mit Hilfe des Software-Assistenten „IWT“, so stark, dass von einer Reproduzierbarkeit der Meßwete ausgegangen werden kann.

Die folgenden Kriterien machen nach Mennel die mit resorptiven Karzinogenen induzierten Tumoren anderen Induktionsformen überlegen:

- Die Induktion erfolgt nicht durch einen direkten externen Reiz.
- Die Tumoren sind morphologisch repräsentativ für die Verhältnisse in der humanen Neuroonkologie.

Die Transplantationstumoren als abgeleitetes Modell der Primärtumoren scheinen in ihrer Histologie ebenfalls mit menschlichen Gliomen vergleichbar zu sein. Die relative kurze Induktionszeit und bessere Reproduzierbarkeit des biologischen Verhaltens lassen sie, als das geeignete Modell für intravitale Verlaufs- (MARTOS et al, 1993) und Therapiekontrollen (MENNEL et al, 1986) in der Neuroonkologie erscheinen.

Aus vorwiegend praktischen Erwägungen wird die Validität des experimentellen Modells anhand der morphologischen Vergleichbarkeit mit menschlichen neurogenen Tumoren beurteilt (MENNEL, 1980).

4.7 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Bereiche

Die Bildgebung könnte auch zur Klärung des Mechanismus und der Dynamik einer Wachstumshemmung eines intracerebralen Tumors eingesetzt werden. Unterschiedliche Mechanismen, die zur Kontrolle des Tumorwachstums eingesetzt werden, wirken zu unterschiedlichen Zeiten des Geschwulstwachstums und greifen an unterschiedlichen Tumorkompartimenten an. So würde eine anti-angiogenetische Behandlung die Neovaskularisation unmöglich machen und damit zu perivaskulären Nekrosen führen. Eine Konventionelle zytostatische Behandlung dürfte vor allem die schnell proliferierenden zytologischen Kompartimente schädigen und dort zu Wachstumshemmung führen. Unterschiedlich applizierte Zytostase-Pulsbehandlung und/oder Dauerbehandlung könnte das Tumorwachstum zu unterschiedlichen Zeiten verlangsamen oder unmöglich ma-

chen. Eine stärkere Auflösung im Bereich der bildgebenden Verfahren könnte hier die unterschiedliche Dynamik des Einwirkens von therapeutischen Maßnahmen und die unterschiedlichen Kompartimente herausstellen und dazu führen, dass in dieser Richtung für alle möglichen Therapieschemata genauere Kenntnisse über Wirkmechanismen und Verläufe gesammelt werden und so die Behandlungsstrategien weiter optimiert werden können.

Insofern eröffnet diese Technik bei fortschreitender Verfeinerung noch vielfältige Möglichkeiten, Tumorwachstum und der Versuch dieses zu kontrollieren, zu untersuchen. Gerade im Bereich Angiogenes und Gefäßproliferationshämmern, wird derzeit mit ähnlichen Tumormodellen bei Mäusen gearbeitet.

5 Zusammenfassung

In der folgenden Arbeit wird die Dokumentation des Wachstums experimentell erzeugter, intrazerebral verimpfter Gliome mit Hilfe der Magnetresonanzbildgebung beschrieben.

Die Erzeugung der Hirntumoren bei Ratten, die den supratentoriellen menschlichen Gliomen des Erwachsenenalters morphologisch ähnlich sind, erfolgte problemlos nach einer etablierten Methode. Da aber die Latenz der durch transplazentarer Induktion erzeugten Tumoren mehrere Monate betrug, war dieses Modell nur bedingt für Wachstumskontrolluntersuchungen geeignet. Es zeigte sich jedoch, dass die aus dem Ursprungstumor gewonnenen Transplantationstumoren sehr gut für eine solches Modell zu verwenden sind. Diese intrazerebral auf syngene Tiere verimpfte Gliome führen innerhalb von 60 bis 30 Tagen, je nach Passage, zum Tod der Tiere. Entsprechende therapeutische Verfahren, die mittlere Überlebenszeit zu verlängern sind erfolgreich getestet worden.

Diese erste Arbeit über eine systematische Untersuchung intrazerebral verimpfter, experimentell erzeugter Tumoren, mit Hilfe des MRT, ermöglicht nun die Beantwortung der Frage der Dynamik des intrazerabralen Wachstums in den 12 untersuchten Passagen. Es war in diesem und ähnlichen Modellen bekannt, dass sich das Tumorwachstum im Verlauf der ersten 12 Transplantationsgenerationen von etwa 10 auf 3 Wochen beschleunigt, allerdings mit beträchtlichen Schwankungen in den aufeinander folgenden Passagen. Hier konnte die in vivo Untersuchung zeigen, dass Tumorwachstum mit dem Tumorvolumen korrelieren.

Ebenfalls war bekannt, dass sich die Morphologie während der zunehmenden Wachstumsgeschwindigkeit ändert. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse bezüglich Lokalisation und Form, vor allem aber bezüglich des feingeweblichen Baus mit der Wachstumsdynamik in den einzelnen Passagen verglichen.

Die Beurteilung des Wachstumsverhaltens solcher intrazerebral verimpfter Hirngeschwülste während der Behandlung gestaltete sich früher besonders schwierig. Zwar wurden diese Tumoren in der Vergangenheit oft mit den unterschiedlichsten Methoden untersucht, nicht zuletzt neuroradiologisch, jedoch setzten diese Methoden in der Regel die Tötung der Tiere voraus.

Diese Arbeit zeigt nun deutlich, indem sie ein neues computergestütztes Verfahren zur Messung von Volumina mit der etablierten lichtmikroskopischen Morphometrie vergleicht, dass die Möglichkeit einer Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Tumoren in vivo und in kurz aufeinander folgenden Abständen gegeben ist. Damit ist es jetzt möglich, das Wachstum der Tumoren unter unbeeinflussten Bedingungen und im Rahmen therapeutischer Protokolle direkt zu verfolgen und die Anzahl der zu tötenden Versuchstiere klein zu halten.

Zum Abschluss ist anzumerken, dass in naher Zukunft, durch innovative Techniken und weitere Leistungssteigerung der MR-Tomographen und die damit verbundene Verbesserung der Detailgenauigkeit des Bildmaterials, sich weitere Möglichkeiten zur Beantwortung von Fragestellungen mit Hilfe des verwendeten Hirntumormodells ergeben können. Diese wären nicht nur Fragen zum Größenvergleich sonder auch zur Zytologie, Gefäßversorgung, Nekrosebildung und vieles mehr.

6 Literaturverzeichnis

1. Anderson
2. Arnold H., Zimmermann H.M.: Experimental brain Tumors. III. Tumors produced with dibenzanthracene. Cancer Res. **3** (1943) 682-685
3. Atkins M.S., Mackiewich B.T.: Fully Automatic Segmentation of the Brain in MRI. IEEE Trans Med Imaging **17** (1). (1998) 98-107
4. Autorenname Kürzel Vorname.: Titel. Untertitel. Ort: Buchverlag (2001)
5. Beispiel, Alfred: Die Beispiel-Homepage. Internet: http://www.Beispielhomepage.de
6. Bernstein M., Berger M.S.: Neuro-oncology. The Essentials. New York: Thieme (2000)
7. Bielschowsky F., Hall W.H.: Carcinogenisis in parabiotic rats. Tumors of the ovary induced by acetaminofluorene in intact females joined to gonadectomized litter-mates and the reaction of their pituitaries to endogenous oestrogens. Brit. J. Cancer **5** (1951) 331
8. Bigner S.H., Bullard D.E., Pegram C.N., Wikstrand C.J., Bigner D.D.: Relationship of in Vitro Morphologic and Growth Characteristics of Establishmed Human Glioma-dervived Cell Lines to their Tumorgenicity in Athymic Nude Mice. J. Neuropathol. Exp. Neurol. **40** (1981) 390-409
9. Bland J.M., Altman D.G.: Measuring agreement in method comparison studies. Statistical Methods in Medical Research **8** (1999) 135-160
10. Brock N., Wilk W.: Zur Ernährung der Laboratoriumstiere 1.Altromin. Arzneim.-Forsch.. **11** (1961) 1071-1080
11. Chen C-N., Hoult D.I.: Biomedicla Magnetic Resonance Technology. Institute of Physics Publishing, Bristol and Philadelphia. (1989)
12. Clarysse A., Kenis J., Mathe G.: Cancer chemotherapy. Recent results in Cancer Research **53**, Berlin (1976)
13. Cramer W., Horning E.S.: Experimental production by oestrin of pituitary tumors with hypopituitarism. Lancet **II** (1936) 247-249
14. Dent J.N., Gadsden E.L., Furth J.: On the relation between thyroid depression and pituitary tumor induction in mice. Cancer Res. **15** (1955) 72-75
15. Dickie M.M., Lane P.W.: Adrenal tumors, pituitary tumors and other pathological changes in F 1 hybrides of strain. De x strain DBA. Cancer Res. **16** (1956) 48-52
16. Dickie M.M.: Spontaneous basophilic tunors of the pituitary gland in gonadectomized mice. Cancer Res. **9** (1949) 372-384

17. Digabel H., Lantuejoul C.: Interactive Algorithms. Proc. 2end European Symp Quantitative Analysis of Microstructures in Material Science, Biology and Medicine. JL Chermant Ed., Stuttgart: Riederer (1978) 85-99

18. Druckrey H., Danneberg P., Dischler W., Steinhoff D.: Reinzucht von 10 Rattenstämmen (BD-Stämme) und Analyse des genetischen Pigmentierungssystems. Arzeim.-Forsch. **12** (1962) 911-919

19. Druckrey H., Ivankovic S., D., Preussmann R.: Organotrope carcinogene Wirkung von Phenyl-dimethyl-triazen an Ratten. Naturwissenschaften **54** (1967) 171

20. Druckrey H., Ivankovic S., Preussmann R.: Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after a single injection ENU to pregnant rats. Nature **210** (1966) 1378-1379

21. Druckrey H., Landschütz C., Ivankovic S.: Transplacentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems II. Äthyl-Nitrosoharnstoff an 10 genetisch definierten Rattenstämmen. Z. Krebsforsch. **73** (1970) 371-386

22. Druckrey H., Preussmann R., Ivancovic S., Schmähl D.: Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. Z. Krebsforsch. **69** (1967) 103-201

23. Druckrey H., Preussmann R., Ivancovic S.: Krebserzeugung durch einmalige Dosis von Methylnitrosoharnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen. Naturwissenschaften **50** (1964) 735

24. Druckrey H., Schildbach A., Schmähl D., Preussmann R., Ivankovic S.: Quantitative Analyse der carcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin. Arzneimittel-Forsch. **13** (1963) 841-851

25. Druckrey H., Schmäh, D.: Die Summationswirkung. Med. Klin. **55** (1960) 648-655

26. Druckrey H.: Genotyps and phenotyps of ten inbred strains of BD-rats. Arzneim.-Forsch. Drug Res. **21** (1971) 1274-1278

27. Ehret M., Jacob, G., Hey A., Segerer S.: Embryonal brain neoplasms in the neonatal period and early infancy. Clin. Neuropathol. **6** (1987) 218-223

28. Furth J., Buffet R.F., Gadsden E.L.: On the pathogenesis of pituitary tumor induction by ionizing radiation. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. **2** (1957) 204

29. Furth J., Burnett W.T.: Hormone-secreting transplantable neoplasms of the pituitary induced by J^{131}. Proc. Soc. Exp. Biol. New York **78** (1951) 222-224

30. Gardener W.U., Pfeifer C.A., Trentin J.-J., Wolsteinhome J.T.: In: The Physiopathology of Cancer. Edts. F. Hamburger and W.H. Fishman. New York: Hoeber-Harper (1953)

31. Gardener W.U., Strong L.C., Smith G.M.: An observation of primary tumors of the pituitary, ovaries, and mammary glands in a mouse. Amer. J. Cancer **26** (1936) 541-546

32. Geissler E., Staneczek W.: SV40 and human brain tumours. Arch. Geschwulstforsch. **58** (1988) 129-134

33. Goldberg R.C. Chaikoff S.-L.: On the nature of hypertrophied pituitary gland induced in the mouse by J^{131} injections and the mechanism of its development. Endocrinology **48** (1951) 1-5

34. Gorbmann A.: Tumorous growths in the pituitary and tracheal following radio toxic dosages of J^{131}. Proc. Soc. Exp. Biol. New York **71** (1949) 237-240

35. Green J.R., Waggner J.D., Kriegsfeld B.A.: Classification and incidence of neoplasms of the central nervous system. Advance in Neurology **15** (1976) 51-55

36. Griepentrog F.: Spontane Hypophysentumoren als häufiger Befund bei weißen Labaratoriumsratten. Beitr. Path. Anat. **130** (1964) 40-50

37. Hahn H.K., Peitgen H.O.: IWT-Interactive Watershed Transform: A hierarchical method for efficient interactive and automated segmentation of multidimensional greyscale images. Proc. Medical Imaging, SPIE 5032. San Diego (2003)

38. Harder W.A.: Die Gliaveränderung bei experimentellen Röntgenspätschäden des Kaninchengehirns. Zbl. Ges. Neurol. Psychiat. **188** (1967) 391-392

39. Haris K., Efstratiadis S.N., Maglaveras N., Katsaggelos A.K. : Hybrid Image Segmentation Using Watersheds and Fast Region Merging. IEEE Trans Image Proc **7** (12). (1998) 1684-1699

40. Hart B.I.: Significance leves fort he ratio of the mean square successive difference to the variance. Ann. Math. Statist. **13** (1942) 445-447

41. Horning E.S.: Oestrogens and neoplasia. H. Burrors and E.S. Horning, edts. Blackwell (1952)

42. Horten B.C., Basler G.A., Shaoiro W.R.: Xenograft of human malignant glial tumors into brains of nude mice. J. Neuropathol. Exp. Neurol. **4** (1989) 493-511

43. Houssay B.A., Houssay A.B., Cardeza A.F., Pinto R.M.: tumours surrenales oestrogeniques et tumours hypophysaires chez les animaux castres . Schweiz. Med. Wschr. **85** (1955) 291-296

44. Ivankovic S., Druckrey H.: Transplazentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. I. Äthylnitrosoharnstoff (ÄNH) an BD-Ratten. Z. Krebsforsch. **71** (1968) 320-360

45. Ivankovic S.: Praenatale Carcinogenese. Handbuch der allgemeinen Pathologie. **6** Band, GeschwülsteIII. Berlin, Heidelberg, New York, Springer (1975) 941-1002

46. Kappler R., Schlegel J., Kindler-Röhrborn A., Mennel H.D., Scherthan H.: Comperativ genomic in-situ hybridization discloses recurrent gain of chromosome 4 in experimental gliomas of the rat. Cytogenet Cell Genet **84** (1999) 194-198

47. King M.D., Van Bruggen N., Ahier R. G., Cremer J.E-, Hajanal J.V., Williams S.R., Doran M.: Diffusion-weighted imaging of kainic acid lesions in the rat brain. Magn. Reson. Med. **20** (1991) 158-164

48. Kirsch W.M., Schultz D.: Anaerobic Energy Metabolism of Brain Tumors. Edts. W.M. Kirsch, E. Grossi-Paoletti and P. Paoletti. Springfield: Charles c. Thomas (1972)

49. Kleiheus P., Cooper H.K.: Repair excision of alkylated bases from DNA in vivo Oncology **33** (1976) 86-88

50. Kobayashi H., Allen N., Clendenon N.R., Ko L.W.: An improved rat brain-tumor model. J.Neurisurg. **53** (1980) 808-815

51. Law L.W.: Observation of the effect of a foolic-acid antagonist on transplantable lymphoid leukemias in mice. J. Natl. Cancer Inst. **10** (1949) 179-192

52. Lindahl T., Sedgwick B.: Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. Ann. Rev. Biochem. **57** (1988) 133-157

53. Loud A. V, Anversa P.: Biology of disease. Morphometric analysis of biologic processes. Lab Invest **50**. (1984) 250-261

54. Magee P.N., Barnes J.M.: The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. Brit. J. Cancer **10** (1956) 114-122

55. Martos J., Peterson D., Klose U., Requardt H., Schabet M., Melms A., Roßberg Ch., Voigt K.: Kernspintomographie des Rattenhirns in einem 1.5-T-Ganzkörpermagneten. Klein. Neuroradiol. 3 (1993) 42-48

56. McEuen C.S., Selye H., Collip J.B.: Some effects of prolonged administration of oestrin in rats. Lancet **230** (1936) 775-776

57. Mennel H. D., Sato K., Zülch K.J.: Traumatische Regeneration und Resorptivkarzinogenese am Zentralnervensystem. Acta neurochir. **25** Wien (1971) 197-206

58. Mennel H.D., Hellwig D., Simon H.: Chemotherapy in intracerebrally transplanted tumors induced with transplacental administration of ethylnitrosourea in rats. J. Cancer Res. Cli. Oncol. **112** (1986) 240-244

59. Mennel H.D., Ivankovic S.: Experimentelle Erzeugung von Tumoren des Nervensystems. Handbuch der allgemeinen Pathologie. **6** Band, GeschwülsteIII. Berlin, Heidelberg, New York, Springer (1975) 33-122

60. Mennel H.D., Rickert D.: AgNOR content and PCNA expression in Transplanted Malignant Neurinomas in Rats. Path Res Pract. **190** (1994) 423-428

61. Mennel H.D., Simon H.: Morphology of early stages of ENU-induced brain tumors in rats. Exp. Pathol. **28** (1985) 207-214

62. Mennel H.D.: Geschwülste des zenralen und peripheren Nervensystems. Spezielle pathologische Anatomie. Band 13/III Pathologie des Nervensystems III. Hrsg.: Doerr, W., Seifert, G. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag (1988) 216-540

63. Mennel H.D.: Morphology of transplacentally induced nervous system tumors in rats: some aspects of this model in neurooncology. Biol. Res. Pregnancy **3** (1982) 122-128

64. Mennel H.D.: Selektive Erzeugung von Carcinomen und Ästhesioneuroepitheliomen in der Nasenhöhle von Ratten durch N-Nitrosopiperidin und N,N´Dinitrosopiperazin bei subcutaner Injektion. Inauguraldissertation, Albert-Ludwig-Universität Freiburg (1966)

65. Mennel H.D.: Short-term Tissue Culture Observation of Experimental Primary and Transplanted Nervous System Tumors. **1** (1980) 1-2

66. Mennel H.D.: Significance of Experimental Models in Neurooncology. Neurosurg. Rev. **3** (1980) 129-137

67. Mennel H.D.: Transplantation of Tumors of the Nervous System Induced by Resorptive Carcinogens. Neurosurg Rev. **1** (1978) 123-131

68. Mennel H.D.: Transplantation of Tumors of the Nervous System Induced by Resorptive Carcinogens. Neurosurg Rev. **2** (1979) 37-41

69. Mennel H.D.: Ultrastructural findings in transplanted experimental brain tumours and their significance for the cytogenesis of such tumours. Exp. Pathol. **33** (1988) 75-86

70. Moore G.E., Brachney E.L., Bock F.G.: Production of pituitary tumours in mice by chronic administration of a thiouracil derivative. Proc. Soc. Exp. Biol. New York **82** (1953) 643-645

71. Moore P.G.: The properties of the mean square successive difference in samples from various populations. J. Amer. Statist. Assoc. **50** (1955) 434-456

72. Neumann J. von, Kent R.H., Bellinson H.B., Hart G.I.: The mean square successive difference. Ann. Math. Statist. **12** (1941) 153-162

73. Oberholzer M.: Morphometrie in der klinischen Pathologie. Allgemeine Grundlagen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. (1983)

74. Oberling C., Guerin M., Guerin P.: La production experimentale de tumeurs hypophysaires chez la rat. C.R. Soc. Biol. Paris **123** (1936) 1152-1154

75. Oberling C., Sanne C., Guerin P., Guerin M.: Sur la relation apparente des tumeurs hypophysaires et du benzpyrene. C.R. Soc. Biol. Paris **131** (1939) 455-457

76. Paumgartner O., Lossa G., Weibel E. R.: Resolution effect on the stereological estimation of surface and volume and its interpretation in terms of fractal dimensions. J. Microse **121** (1981) 51-59

77. Peers J.H.,: The response of the central nervous system to the application of carcinogenic hydrocarbons. II. Methylcholanthrene. Amer. J. Path. **16** (1940) 799-861

78. Peers J.H.,: The response of the central nervous system to the application of carcinogenic hydrocarbons. I.Dibenzanthracene. Amer. J. Path. **15** (1939) 261-277

79. Poeck K., Hacke W.: Neurologie **11.** Berlin Heidelberg New York: Springer (2001)

80. Price C.C.: Chemestry of alkylation. Handbuch der experimentellen Pharmakologie Bd. **38**, Part 2, Ch. 30, Berlin (1975)

81. Rajewski M.F.: Proliferativ properties of malignant cell systems. Handbuch der der allgemeinen Pathologie VI/5-6. Berlin (1975)

82. Rama B., Mandel T., Jansen J., Dingeldein E., Mennel H.D.: The intraneoplastic chemotherapy in arat brain tumor model utilizing methotrexat-polymethacralate pellets. Acta neurochir.: Wien **87** (1987) 70-75

83. Rama B., Spoerri O., Holzgraefe M., Mennel H.D.: Current Brain Tumors Models with Particular Consideration of the Transplantation Techniques. Acta Neurichir. **79** (1986) 35-41

84. Robert Koch Institut. Internet: http://www.rki.de

85. Rosenfeld M.G., Crenshaw E.B., Lira S.A., Swanson L., Borrelli E., Heyman R., Evans R.M.: Transgenic mice: Applications to the study of the nervous system. Ann. Rev. Neurosci. **11** (1988) 353-372

86. Rubinstein L.J..: Embryonal central neuroepithelial tumors and their differentiating potential. J. Neurosurg. **62** (1985) 795-805

87. Rudin M., Sauter A.: Noninvasiv Determination of Regional Cerebral blood flow in rats using dynamic imaging with Gd(DTPA). Magn. Reson. Med. **22** (1991) 32-46

88. Runge V.M., Gelblum D.Y., Jacobson S.: Gd HP-DO3A – Experimental Evaluation in brain and renal MR. Magn. Reson. Imag. **9** (1991) 79-87

89. Runge V.M., Jacobson S., Wood M.L., Kaufman D., Adelman L.S.: MR Imaging of rat brain glioma: GD-DTPA versus GD-DOTA. Radiology **166** (1988) 835-838

90. Russel D.S., Rubinstein L.J.: Pathology of Tumours of the Nervous System. 5th ed. Bultimore: Williams & Wilkins (1989)

91. Schabel F.M.: Nitrosoureas. A Review of Experimentel Antitumor Activity, Cancer Treat. Rep. **6** (1976) 665-698

92. Schechter A.L., Sretn D.F., Vaidyanathan L., Decker S.J., Drebin J.A., Greene M.I., Weinberg R.A.: The neu oncogene. An erb-B-related gene encoding a 185.000-M tumour antigen. Nature **312** (1984) 513-516

93. Schepartz S.A.: Early History and Development of the Nitosoureas. Cancer Treat. Rep. **6** (1976) 647-649

94. Schild H.H.: MRI made easy. Schering-Verlag 2. Edition (1997)

95. Schulze E.: Spontantumoren der Schgädelhöhle und Genitalorgane bei Sprague-Dawley- und Bethesda_Black-Ratten. Z. Krebsforsch. **64** (1960) 78-82

96. Sclegel W., Bille J.: Medizinische Physik. Bd. 2. Medizinische Strahlenphysik. Springer (2002)

97. Seligman A.M., Shear J.M.: Studies in carcinogenesis. VIII. Experimental production of brain tumors in mice with methylcholanthrene. Amer. J. Cancer **37** (1939) 364-395

98. Silberberg R., Silberberg M.: Joint disease in mice thyroidectomized with radioiodine J^{131}. Proc. Soc. Exp. Biol. New York **85** (19554) 448-450

99. Soille P.: Morphological Image Analysis. 2nd Ed., Berlin: Springer (2003)

100. Tamura M., Mennel H.D., Zülch K.J.: Brain Tumor Chemotherapy Using a Rat Glioma Model. J. Cancer Res. Clin. Oncol. **94** (1979) 39-46

101. Tator C.H., Day A., Ng R., Liberman, L.: Chemotherapy of an Experimental Glioma with Nitrosoureas. Cancer Res. **37** (1977) 476-481

102. Ting Y.L., Bendel P.: Thin-section MR imaging of rat brain at 4.7 T. JMRI **2** (1992) 393-399

103. Underwood E. E.: Quantitativ stereology. Addison-Wesley Publishing Comp, Reading. (1970)

104. Vasquez-Lopez E.: On the growth of Rous sarcoma virus inoculation into the brain. Am. J. Cancer **26** (1936) 29-55

105. Vincent L., Soille P.: Watersheds in Digital Spaces. An Efficient Algorithm Based on Immersion Simulations. IEEE TPAMI **13** (6), June (1991) 583-598

106. Wechsler W.: Old and new concepts of oncogenesis in the nervous system of man and animals. Recent advances in Brain Tumour Research, Vol **17** Basel. Karger (1972)

107. Weibel E. R.: Stereological methods. Vol.1: Practical methods for biological morphpometry. Academic Press, London (1979)

108. Wheeler G.P.: Mechanism of action of nitrosoureas. Handbuch der experimentellen Pharmakologie Bd. **38**, Part 2, Ch. 35, Berlin (1975)

109. Wiestler O.D., Pegg A.E., Kleiheus P.: Repair of 06-alkylguanine in cellular DNA. signification for tumour induction and chemotherapy. Chemotherapy of gliomas. Hrsg. Voth D., Krausenech P. Berlin De Gruyter (1984) 61-69

110. Wilson C.B., Bates E. A.: Transplantable brain Tumors. The experimentel biology of brain Tumors. Hrsg.: Kirsch W. M. Springfield (Illinois) (1972) 19-56

111. Zarbl H., Sukumar S., Arthur A.V., Martin-Zanca D., Barbacid M.: Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methyurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. Nature **315** (1985) 382-385

112. Zimmerman H.M., Arnold H.: Experimental brain tumors. I. Tumors produced by methylcholanthren. Cancer Res. **1** (1941) 919-938

113. Zimmerman H.M., Arnold H.: Experimental brain tumors. II. Produced by benzpyren. Amer. J. Path. **19** (1943) 939-955

114. Zimmermann H.M.: Brain Tumors. Their incidence and classification in man and their experimental production. Ann. New York Acad. Sci. **159** (1969) 337-359

115. Zimmermann H.M.: Experimental Brain Tumors. Fields and Sharkey. The Biology and Trearment of Intracranial Tumors. Springfield I11 Charles C. Thomas Publ. (1962)

116. Zondek B.: Tumors of the pituitary induced with follicular hormone. Lancet **230** (1936) 776

117. Zülch K.J.: Brain Tumours. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer (1986)

7 Anhang

7.1 Tabellen

7.1.1 Volumen Messwerte der lichtmikroskopischen Morphometrie

T.-NR.	Passage	Observer 1 ml	Observer 2 ml	T.-NR.	Passage	Observer 1 ml	Observer 2 ml
901	6	0,030	0,033	58	10	0,224	0,227
797	5	0,021	0,020	57	10	0,144	0,139
786	4	0,030	0,017	55	10	0,037	0,035
63	12	0,031	0,035	54	9	0,239	0,245
66	12	0,061	0,068	53	9	0,073	0,086
779	3	0,006	0,014	70	8	0,074	0,066
788	4	0,034	0,044	41	6	0,035	0,048
872	Primärtumor	0,002	0,002	38	6	0,134	0,170
794	5	0,031	0,033	902	6	0,170	0,183
42	6	0,048	0,069	783	4	0,199	0,175
791	5	0,038	0,039	795	5	0,006	0,004
40	6	0,015	0,043	789	4	0,008	0,008
65	12	0,052	0,060	873	Primärtumor	0,012	0,019
64	12	0,048	0,068	904	2	0,014	0,016
62	11	0,008	0,011	795	5	0,026	0,031
61	11	0,171	0,204	800	1	0,103	0,136
60	11	0,066	0,056	781	3	0,412	0,410
59	11	0,062	0,074				

7.1.2 Volumen-Messwerte der CISS-Aufnahmen berechnet mit der IWTTechnik

T.-NR.	Passage	Observer 1 ml	Observer 2 ml	T.-NR.	Passage	Observer 1 ml	Observer 2 ml
901	6	0,035	0,046	58	10	0,305	0,248
797	5	-	-	57	10	0,146	0,155
786	4	0,022	0,023	55	10	0,159	0,075
63	12	0,079	0,067	54	9	0,262	0,265
66	12	0,0146	0,097	53	9	0,136	0,083
779	3	0,078	0,045	70	8	0,036	0,069
788	4	-	-	41	6	0,133	0,076
872	Primärtumor	-	-	38	6	0,162	0,189
794	5	0,018	0,055	902	6	0,102	0,209
42	6	0,051	0,061	783	4	0,225	0,227
791	5	0,070	0,040	795	5	0,097	0,064
40	6	0,092	0,054	789	4	0,086	0,027
65	12	0,233	0,130	873	Primärtumor	0,153	0,056
64	12	0,125	0,031	904	2	0,065	0,065
62	11	0,039	0,010	795	5	0,097	0,82
61	11	0,192	0,197	800	1	0,026	0,132
60	11	0,083	0,061	781	3	0,559	0,368
59	11	0,129	0,125				

7.1.3 Volumen-Messwerte der DESS-Aufnahmen berechnet mit der IWT-Technik

T.-NR.	Passage	Observer 1 ml	Observer 2 ml	T.-NR.	Passage	Observer 1 ml	Observer 2 ml
901	6	-	-	58	10	0,198	0,229
797	5	0,032	0,033	57	10	-	-
786	4	0,012	0,039	55	10	-	-
63	12	0,079	0,068	54	9	-	-
66	12	0,268	0,107	53	9	-	-
779	3	0,059	0,068	70	8	-	-
788	4	0,020	0,057	41	6	0,135	0,091
872	Primärtumor	0,014	0,021	38	6	0,127	0,160
794	5	-	-	902	6	0,051	0,181
42	6	0,053	0,067	783	4	0,178	0,181
791	5	0,053	0,055	795	5	0,099	0,080
40	6	0,114	0,072	789	4	0,059	0,043
65	12	0,064	0,096	873	Primärtumor	0,117	0,097
64	12	0,108	0,081	904	2	0,073	0,060
62	11	-	-	795	5	0,099	0,060
61	11	-	-	800	1	0,029	0,136
60	11	-	-	781	3	0,480	0,372
59	11	0,105	0,097				

7.1.4 Dosierungstabellen der Anästhetika

Gewicht in g	Ketavet® 50mg/ml					Rompun 2%
	40 mg/kg	50mg/kg	70 mg/kg	90 mg/kg	100 mg/kg	
10	0,008	0,010	0,014	0,018	0,020	0,006
70	0,056	0,007	0,098	0,126	0,140	0,042
80	0,064	0,008	0,112	0,144	0,160	0,048
90	0,072	0,009	0,126	0,162	0,180	0,054
100	0,080	0,010	0,140	0,180	0,200	0,060
110	0,088	0,011	0,154	0,198	0,220	0,066
120	0,096	0,012	0,168	0,216	0,240	0,072
130	0,104	0,013	0,182	0,234	0,260	0,078
140	0,112	0,014	0,196	0,252	0,280	0,084
150	0,120	0,015	0,210	0,270	0,300	0,090
160	0,128	0,016	0,224	0,288	0,320	0,096
170	0,136	0,017	0,238	0,306	0,340	0,102
180	0,144	0,018	0,252	0,324	0,360	0,108
190	0,152	0,019	0,266	0,342	0,380	0,114
200	0,160	0,020	0,280	0,360	0,400	0,120
210	0,168	0,021	0,294	0,378	0,420	0,126
220	0,176	0,022	0,308	0,396	0,440	0,132
230	0,184	0,023	0,322	0,414	0,460	0,138
240	0,192	0,024	0,336	0,432	0,480	0,144
250	0,200	0,025	0,350	0,450	0,500	0,150
260	0,208	0,026	0,364	0,468	0,520	0,156
270	0,216	0,027	0,378	0,486	0,540	0,162
280	0,224	0,028	0,392	0,504	0,560	0,168
290	0,232	0,029	0,406	0,522	0,580	0,174
300	0,240	0,030	0,420	0,540	0,600	0,180
310	0,248	0,031	0,434	0,558	0,620	0,186
320	0,256	0,032	0,448	0,576	0,640	0,192
330	0,264	0,033	0,462	0,594	0,660	0,198
340	0,272	0,034	0,476	0,612	0,680	0,204
350	0,280	0,035	0,490	0,630	0,700	0,210
360	0,288	0,036	0,504	0,648	0,720	0,216
370	0,296	0,037	0,518	0,666	0,740	0,222
380	0,304	0,038	0,532	0,684	0,760	0,228
390	0,312	0,039	0,546	0,702	0,780	0,234
400	0,320	0,040	0,560	0,720	0,800	0,240
410	0,328	0,041	0,574	0,738	0,820	0,246
420	0,336	0,042	0,588	0,756	0,840	0,252
430	0,344	0,043	0,602	0,774	0,860	0,258
440	0,352	0,044	0,616	0,792	0,880	0,264
450	0,360	0,045	0,630	0,810	0.900	0,270

Gewicht in g	Ketavet® 100mg/ml					Rompun 2%
	40 mg/kg	50 mg/kg	70 mg/kg	90 mg/kg	100 mg/kg	
10	0,004	0,005	0,007	0,009	0,010	0,006
70	0,028	0,035	0,049	0,063	0,070	0,042
80	02032	0,040	0,056	0,072	0,080	0,048
90	0,036	0,045	0,063	0,081	0,090	0,054
100	0,040	0,050	0,070	0,090	0,100	0,060
110	0,044	0,055	0,077	0,099	0,110	0,066
120	0,048	0,060	0,084	0,108	0,120	0,072
130	0,052	0,065	0,091	0,117	0,130	0,078
140	0,056	0,070	0,098	0,126	0,140	0,084
150	0,060	0,075	0,105	0,135	0,150	0,090
160	0,064	0,080	0,112	0,144	0,160	0,096
170	0,068	0,085	0,119	0,153	0,170	0,102
180	0,072	0,090	0,126	0,162	0,180	0,108
190	0,076	0,095	0,133	0,171	0,190	0,114
200	0,080	0,100	0,140	0,180	0,200	0,120
210	0,084	0,105	0,147	0,189	0,210	0,126
220	0,088	0,110	0,154	0,198	0,220	0,132
230	0,092	0,115	0,161	0,207	0,230	0,138
240	0,096	0,120	0,168	0,216	0,240	0,144
250	6,100	0,125	0,175	0,225	0,250	0,150
260	0,104	0,130	0,182	0,234	0,260	0,156
270	0,108	0,135	0,189	0,243	0,270	0,162
280	0,112	0,140	0,196	0,252	0,280	0,168
290	0,116	0,145	0,203	0,261	0,290	0,174
300	0,120	0,150	0,210	0,270	0,300	0,180
310	0,124	0,155	0,217	0,279	0,310	0,186
320	0,128	0,160	0,224	0,288	0,320	0,192
330	0,132	0,165	0,231	0,297	0,330	0,198
340	0,136	0,170	0,238	0,306	0,340	0,204
350	0,140	0,175	0,245	0,315	0,350	0,210
360	0,144	0,180	0,252	0,324	0,360	0,216
370	0,148	0,185	0,259	0,333	0,370	0,222
380	0,152	0,190	0,266	0,342	0,380	0,228
390	0,156	0,195	0,273	0,351	0,390	0,234
400	0,160	0,200	0,280	0,360	0,400	0,240
410	0,164	0,205	0,287	0,369	0,410	0,246
420	0,168	0,210	0,294	0,378	0,420	0,252
430	0,172	0,215	0,301	0,387	0,430	0,258
440	0,176	0,220	0,308	0,396	0,440	0,264
450	0,180	0,225	0,315	0,405	0,450	0,270

7.1.5 Verimpfungsprotokoll der Transplantationstumorlinie G-XIX

DATUM DER VERIMP-FUNG	SPEN-DER	EMP-FÄNGER	PAS-SAGE	QUANTI-TATIVE VERIMP-FUNG	KEINE QUANTI-TATIVE VERIMP-FUNG	TUMOR-ENTNAHME	INDUK-TIONS-ZEIT
24.11.2001	T 873	T 799	1		n.q.	04.01.2002	41
		T 800	1		n.q	10.01.2002	47
04.01.2002	T 799	T 903	2		n.q.	08.02.2002	35
		T 904	2		n.q.	18.02.2002	45
18.02.2002	T 904	T 779	3	100000 Z/T		30.03.2002	40
		T 780	3		n.q.	23.03.2002	33
		T 781	3	100000 Z/T		09.04.2002	50
30.03.2002	T 779	T 782	4	100000 Z/T		24.05.2002	55
		T 783	4	100000 Z/T		09.06.2002	71
		T 784	4	100000 Z/T		25.05.2002	56
		T 785	4	100000 Z/T		25.06.2002	87
		T 786	4	100000 Z/T		28.05.2002	59
		T 787	4	100000 Z/T		21.05.2002	52
		T 788	4	100000 Z/T		09.06.2002	71
		T 789	4	100000 Z/T		08.06.2002	70
		T 790	4		n.q.	08.05.2002	39
21.05.2002	T 787	T 791	5	100000 Z/T		01.07.2002	41
		T 792	5	100000 Z/T		09.07.2002	49
09.06.2002	T 788	T 793	5	100000 Z/T		07.08.2002	59
		T 794	5	100000 Z/T		23.07.2002	44
		T 795	5	100000 Z/T		23.07.2002	44
		T 796	5	100000 Z/T		31.07.2002	52
		T 797	5	100000 Z/T		25.07.2002	46
		T 798	5	100000 Z/T		02.08.2002	54
23.07.2002	T 795	T 901	6	100000 Z/T		02.09.2002	41
		T 902	6	100000 Z/T		25.09.2002	64
25.07.2002	T 797	T 037	6	100000 Z/T		04.09.2002	41
		T 038	6	100000 Z/T		27.09.2002	65
		T 039	6	100000 Z/T		04.09.2002	41
		T 040	6	100000 Z/T		05.09.2002	42
		T 041	6	100000 Z/T		29.09.2002	66
		T 042	6	100000 Z/T		06.09.2002	43
02.09.2002	T 901	T 045	7	100000 Z/T		09.10.2002	37
		T 046	7	100000 Z/T		10.09.2002	38
06.09.2002	T 040	T 043	7	100000 Z/T		14.10.2002	38
		T 047	7	100000 Z/T		14.10.2002	38
09.10.2002	T 045	T 069	8	100000 Z/T		28.10.2002	19

		T 070	8	100000 Z/T		19.11.2002	41
15.10.2002	T 043	T 094	8	100000 Z/T		12.12.2002	58
		T 095	8	100000 Z/T		08.11.2002	24
19.11.2002	T 070	T 051	9	100000 Z/T		16.12.2002	27
		T 052	9	100000 Z/T		18.12.2002	29
		T 053	9	100000 Z/T		27.12.2002	38
		T 054	9	100000 Z/T		10.01.2003	52
18.12.2002	T 052	T 055	10	100000 Z/T		23.01.2003	36
		T 056	10	100000 Z/T		29.01.2003	42
		T 057	10	100000 Z/T		23.01.2003	36
		T 058	10	100000 Z/T		14.02.2003	52
23.01.2003	T 055	T 059	11	100000 Z/T		01.03.2003	37
		T 060	11	100000 Z/T		19.02.2003	27
		T 061	11	100000 Z/T		24.02.2003	32
		T 062	11	100000 Z/T		20.02.2003	28
20.02.2003	T062	T 063	12	100000 Z/T		01.04.2003	40
		T 064	12	100000 Z/T		28.03.2003	36
		T 065	12	100000 Z/T		01.04.2003	40
		T 066	12	100000Z/T		21.03.2003	29

7.1.6 MRT-Aufnahmenprotokolle

7.1.6.1 Primärtumoren

T-NR.	MRT	GESCHLECHT	STAMM	GEBOREN	VERSTORBEN
875	31.07.2001	W	BD-IX	05.05.2001	
875	29.10.2001	W	BD-IX		
875	09.11.2001	W	BD-IX		
875	12.11.2001	W	BD-IX		12.11.2001
874	14.08.2001	W	BD-IX	05.05.2001	
874	29.10.2001	W	BD-IX		29.10.2001
873	21.08.2001	W	BD-IX	05.05.2001	
873	05.11.2001	W	BD-IX		
873	21.11.2001	W	BD-IX		24.11.2001
872	24.10.2001	W	BD-IX	05.05.2001	
872	09.11.2001	W	BD-IX		
872	21.11.2001	W	BD-IX		21.11.2001

7.1.6.2 Transplantationstumoren G-XIX-1

T-NR.	MRT	GESCHLECHT	STAMM	PASSAGE	VERSTORBEN
799	19.12.2001	M	BD-IX	1	
799	27.12.2001	M	BD-IX	1	
799	02.01.2002	M	BD-IX	1	04.01.2002
800	19.12.2001	M	BD-IX	1	
800	27.12.2001	M	BD-IX	1	
800	02.01.2002	M	BD-IX	1	10.01.2002

7.1.6.3 Transplantationstumoren G-XIX-2

T-NR.	MRT	GESCHLECHT	STAMM	PASSAGE	VERSTORBEN
903	23.01.2002	W	BD-IX	2	
903	31.01.2002	W	BD-IX	2	
903	08.02.2002	W	BD-IX	2	08.02.2002
904	23.01.2002	W	BD-IX	2	
904	31.01.2002	W	BD-IX	2	
904	08.02.2002	W	BD-IX	2	
904	14.02.2002	W	BD-IX	2	18.02.2002

7.1.6.4 Transplantationstumoren G-XIX-3

T-NR.	MRT	GESCHLECHT	STAMM	PASSAGE	VERSTORBEN
779	06.03.2002	M	BD-IX	3	
779	12.03.2002	M	BD-IX	3	
779	27.03.2002	M	BD-IX	3	30.03.2002
780	06.03.2002	W	BD-IX	3	
780	12.03.2002	W	BD-IX	3	
780	22.03.2002	W	BD-IX	3	22.03.2002
781	06.03.2002	W	BD-IX	3	
781	12.03.2002	W	BD-IX	3	
781	22.03.2002	W	BD-IX	3	
781	27.03.2002	W	BD-IX	3	
781	03.04.2002	W	BD-IX	3	
781	09.04.2002	W	BD-IX	3	09.04.2002

7.1.6.5 Transplantationstumoren G-XIX-4

T-NR.	MRT	GESCHLECHT	STAMM	PASSAGE	VERSTORBEN
788	24.04.2002	M	BD-IX	4	
788	01.05.2002	M	BD-IX	4	
788	08.05.2002	M	BD-IX	4	
788	15.05.2002	M	BD-IX	4	
788	22.05.2002	M	BD-IX	4	
788	28.05.2002	M	BD-IX	4	
788	05.06.2002	M	BD-IX	4	09.06.2002
789	01.05.2002	M	BD-IX	4	
789	08.05.2002	M	BD-IX	4	
789	15.05.2002	M	BD-IX	4	
789	22.05.2002	M	BD-IX	4	
789	28.05.2002	M	BD-IX	4	
789	05.06.2002	M	BD-IX	4	08.06.2002
790	24.04.2002	M	BD-IX	4	
790	08.05.2002	M	BD-IX	4	08.05.2002
786	28.05.2002	M	BD-IX	4	28.05.2002
783	28.05.2002	M	BD-IX	4	
783	05.06.2002	M	BD-IX	4	09.06.2002
785	28.05.2002	M	BD-IX	4	
785	05.06.2002	M	BD-IX	4	25.06.2002

7.1.6.6 Transplantationstumoren G-XIX-5

T-NR.	MRT	GESCHLECHT	STAMM	PASSAGE	VERSTORBEN
791	19.06.2002	M	BD-IX	5	
791	26.06.2002	M	BD-IX	5	01.07.2002
792	19.06.2002	M	BD-IX	5	
792	26.06.2002	M	BD-IX	5	
792	03.07.2002	M	BD-IX	5	09.07.2002
793	10.07.2002	W	BD-IX	5	
793	19.07.2002	W	BD-IX	5	
793	24.07.2002	W	BD-IX	5	
793	31.07.2002	W	BD-IX	5	07.08.2002

794	10.07.2002	W	BD-IX	5	
794	19.07.2002	W	BD-IX	5	23.07.2002
794	10.07.2002	W	BD-IX	5	
794	19.07.2002	W	BD-IX	5	23.07.2002
795	10.07.2002	W	BD-IX	5	
795	20.07.2002	W	BD-IX	5	23.07.2002
796	12.07.2002	W	BD-IX	5	
796	20.07.2002	W	BD-IX	5	
796	24.07.2002	W	BD-IX	5	
796	31.07.2002	W	BD-IX	5	31.07.2002
797	12.07.2002	M	BD-IX	5	
797	20.07.2002	M	BD-IX	5	25.07.2002
798	12.07.2002	M	BD-IX	5	
798	19.07.2002	M	BD-IX	5	
798	31.07.2002	M	BD-IX	5	
789	24.07.2002	M	BD-IX	5	02.08.2002

7.1.6.7 Transplantationstumoren G-XIX-6

T-NR.	MRT	GESCHLECHT	STAMM	PASSAGE	VERSTORBEN
901	30.08.2002	M	BD-IX	6	02.09.2002
902	30.08.2002	M	BD-IX	6	
902	04.09.2002	M	BD-IX	6	
902	11.09.2002	M	BD-IX	6	
902	20.09.2002	M	BD-IX	6	
902	25.09.2002	M	BD-IX	6	25.09.2002
038	04.09.2002	M	BD-IX	6	
038	11.09.2002	M	BD-IX	6	
038	20.09.2002	M	BD-IX	6	
038	25.09.2002	M	BD-IX	6	27.09.2002
040	04.09.2002	M	BD-IX	6	06.09.2002
041	06.09.2002	W	BD-IX	6	
041	11.09.2002	W	BD-IX	6	
041	20.09.2002	W	BD-IX	6	
041	25.09.2002	W	BD-IX	6	29.09.2002
042	06.09.2002	W	BD-IX	6	06.09.2002

7.1.6.8 Transplantationstumoren G-XIX-7

VON PASSAGE 7 SIND KEINE AUFNAHMEN GEMACHT WORDEN!

7.1.6.9 Transplantationstumoren G-XIX-8

T-NR.	MRT	GESCHLECHT	STAMM	PASSAGE	VERSTORBEN
070	01.11.2002	W	BD-IX	8	
070	08.11.2002	W	BD-IX	8	19.11.2002
094	01.11.2002	W	BD-IX	8	
094	08.11.2002	W	BD-IX	8	
094	19.11.2002	W	BD-IX	8	
094	11.12.2002	W	BD-IX	8	12.12.2002
095	01.11.2002	W	BD-IX	8	
095	08.11.2002	W	BD-IX	8	08.11.2002

7.1.6.10 Transplantationstumoren G-XIX-9

T-NR.	MRT	GESCHLECHT	STAMM	PASSAGE	VERSTORBEN
053	27.12.2002	M	BD-IX	9	27.12.2002
054	27.12.2002	W	BD-IX	9	
054	03.01.2003	W	BD-IX	9	
054	08.01.2003	W	BD-IX	9	10.01.2003

7.1.6.11 Transplantationstumoren G-XIX-10

T-NR.	MRT	GESCHLECHT	STAMM	PASSAGE	VERSTORBEN
055	08.01.2003	W	BD-IX	10	
055	15.01.2003	W	BD-IX	10	
055	23.01.2003	W	BD-IX	10	23.01.2003
056	08.01.2003	W	BD-IX	10	
056	15.01.2003	W	BD-IX	10	
056	24.01.2003	W	BD-IX	10	
056	28.01.2003	W	BD-IX	10	29.01.2003
057	10.01.2003	M	BD-IX	10	
057	16.01.2003	M	BD-IX	10	23.01.2003
058	10.01.2003	M	BD-IX	10	
058	16.01.2003	M	BD-IX	10	
058	24.01.2003	M	BD-IX	10	
058	31.01.2003	M	BD-IX	10	
058	07.02.2003	M	BD-IX	10	
058	14.02.2003	M	BD-IX	10	14.02.2003

7.1.6.12 Transplantationstumoren G-XIX-11

T-NR.	MRT	GESCHLECHT	STAMM	PASSAGE	VERSTORBEN
059	19.02.2003	W	BD-IX	11	
059	25.02.2003	W	BD-IX	11	01.03.2003
060	19.02.2003	W	BD-IX	11	19.02.2003
061	19.02.2003	W	BD-IX	11	24.02.2003
062	19.02.2003	W	BD-IX	11	20.02.2003

7.1.6.13 Transplantationstumoren G-XIX-12

T-NR.	MRT	GESCHLECHT	STAMM	PASSAGE	VERSTORBEN
063	05.03.2003	W	BD-IX	12	
063	12.03.2003	W	BD-IX	12	
063	24.03.2003	W	BD-IX	12	
063	31.03.2003	W	BD-IX	12	01.04.2003
064	05.03.2003	M	BD-IX	12	
064	12.03.2003	M	BD-IX	12	
064	20.03.2003	M	BD-IX	12	
064	24.03.2003	M	BD-IX	12	
064	28.03.2003	M	BD-IX	12	28.03.2003
065	05.03.2003	W	BD-IX	12	
065	12.03.2003	W	BD-IX	12	
065	18.03.2003	W	BD-IX	12	
065	24.03.2003	W	BD-IX	12	
065	31.03.2003	W	BD-IX	12	01.04.2003
066	05.03.2003	M	BD-IX	12	
066	12.03.2003	M	BD-IX	12	
066	18.03.2003	M	BD-IX	12	21.03.2003

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name und Vorname:	Kosse Nils Jurriaan
Geburtsdatum:	01.11.1977
Geburtsort:	Offenbach am Main
Familienstand:	ledig
Vater:	Kosse Walter Josef
	Gynäkologe
Mutter	Kosse Ellen geborene Langendonk
	selbstständig

Schulischer Werdegang

1985 – 1989	Sonnentauschule Obertshausen
1989 – 1997	Leibniz-Gymnasium Offenbach am Main
24.06.1997	Abitur

Universitärer Werdegang

WS 1997/98	Beginn des Studiums der Medizin
	an der Philipps-Universität Marburg
14.03.2000	Ärztliche Vorprüfung
28.08.2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09.09.2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03.12.2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
27.12.2004	Approbation

Veröffentlichungen

2003 (Poster)	Heverhagen JT, Kosse NJ, Alfke H, Riegel T, Mennel HD: Correlation of experimental damage in MRI and morphology in the rat brain. Acta Neuropathol 104 (2003) 543-581
2004 (Paper)	Mennel HD, Kosse NJ, Heverhagen JT, Alfke H: Primary and transplanted NEU induced rat tumors in neurooncology. Experimental and Toxicologic Pathology 56 (2004) 25-35

9 Meine Akademischen Lehrer

- Abteilung für Molekulare Neurowissenschaften
  Weihe, Eberhard Prof. Dr. med.

- Allgemeine Augenheilkunde Netzhauterkrankungen
  Meyer, Carsten Dr. med

- Allgemeinmedizin
  Baum, Erika Prof. Dr. med.

- Anästhesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin
  Kroh, Udo Prof. Dr. med.

- Augenheilkunde
  Hesse, Lutz Priv. Doz. Dr. med

- Biochemie
  Hasilik, Andrej Prof. Dr. rer. nat.

- Biochemische Endokrinologie
  Koolman, Jan Prof. Dr.

- Chirurgie
  Lorenz, Wilfried Prof. Dr. med.

  Rothmund, Matthias Prof. Dr. med.

- Entwicklungs- & Neurobiologie
  Westermann, Reiner PD Dr.

- Gastroenterologie
  Katschinski, Martin Prof. Dr. med.

- Herz- und thorakale Gefäßchirurgie
  Moosdorf, Rainer Prof. Dr. med.

- Hirntumor-Chirurgie, Wirbelsäulenchirurgie
  Bertalanffy, Helmut Prof. Dr. med.

- HNO-Heilkunde
  Werner, Jochen-Alfred Prof. Dr. med.

- Humangenetik
  Grzeschik, Karl-Heinz Prof. Dr. rer. nat.

- Immunbiologie
  Steiniger, Birte Prof. Dr. med.

- Immunologi
  Garn, Holger Dr. rer. nat.

- Innere
  Neubauer, Andreas Prof. Dr. med.

- Innere Med.-Nephrol.-Intensivmed.-Organtransplant.
  Lange, Harald Prof. Dr. med.

- Innere Medizin
  Arnold, Rudolf Prof. Dr. med.

  Wagner, Ulrich PD. Dr. med.

- Inst. für Medizinische Biometrie und Epidemiologie
  Jäger, Ralf Dr. rer. Nat.

  Schäfer, Helmut Prof. Dr. rer. Nat.

- Interventionelle Radiologie
  Wagner, Hans-Joachim Prof. Dr.

- Kardiologie
  Grimm, Wolfram PD Dr.

- Kardiologie Angiologie internistische Intensivmed.
  Maisch, Bernhard Prof. Dr. med.

- Kinder- und Jugendpsychiatrie
  Hebebrand, Johannes Prof. Dr. med.

- Kl. für Gastroenterologie und Endokrinologie
  Printz, Hartmut OA Dr.

- Klin. Forschergr. Chronische Atemwegserkrankungen
  Göke, Rüdiger Prof. Dr. med.

- Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie
  Vogt, Sebastian Prof. Dr. med.

- Klinik für Kardiologie
  Herzum, Matthias PD Dr. med.

- Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
  Renz, Harald Prof. Dr. med.

- Knochenmarktransplantation
  Beyer, Joerg PD Dr. med.

- Med Mikrobiologie – Infektionsimmunologie
  Sommer, Frank Dr. med.

- Medizin
  Gudermann, Thomas Prof. Dr. med.

- Medizinische Informatik
  Kuhn, Klaus A. Prof. Dr. med.

- Medizinische Psychologie
  Keller, Stefan Dr. rer. nat.

- Medizinische Soziologie
  Heller, Günther Dr. med.

- Methodenwissenschaften und Gesundheitsforschung
  Mueller, Ulrich Prof. Dr. phil. Dr. med.

- Mikrobiologie Immunologie
  Lohoff, Michael Prof. Dr. med.

- Molekularbiologie
  Eilers, Martin Prof. Dr.

- Neurobiologie Immunologie
  Bette, Michael Dr.

- Neuroendokrinologie und Neurodynamik
  Voigt, Karlheinz Prof. Dr. med.

- Neurologie
  Oertel, Wolfgang H. Prof. Dr. med.

- Neuropathologie
  Mennel, Hans-Dieter Prof. Dr. med.

- Nuklearmedizin
  Höffken, Helmut Priv. Doz. Dr. med.

- Orthopädie und Rheumatologie
  Pfeiffer, Michael Priv. Doz. Dr. med.

- Pädiatrie
  Seyberth, Hannsjörg Wilhelm Prof. Dr. med.

- Pathologie
  Moll, Roland Prof. Dr. med.

- Pharmakologie
  Czubayko, Frank Prof. Dr. med.

- Phoniatrie und Pädaudiologie
  Berger, Roswitha Prof. Dr. med.

- Physiologie
  Lang, Rudolf Ernst Prof. Dr. med.

- Physiologie-Cardiovasculäre Zellphysiologie
  Preisig-Müller, Regina Dr. rer. nat.

- Pneumologie mit Schlafmedizin
  Penzel, Thomas Prof. Dr. rer. physiol. Dipl. Phys.

- Psychiatrie & Psychotherapie des Kindes- & Jugendalters
  Wehmeier, Peter M. Dr.

- Psychologie
  Basler, Heinz-Dieter Prof. Dr. phil. Dr. med. habil.

- Radiologie
  Klose, Klaus Jochen Prof. Dr. med.

- Strahlenschutz
  Jungclas, Hartmut Prof. Dr. med.

- Strahlentherapie
  Groß, Markus Dr. med.

- Theoret. Chir.-Tumorangiogenese-Perioperat. Risiko
  Celik, Ilhan PD Dr. med.

- Transfusionsmedizin und Hämostaseologie
  Kretschmer, Volker Prof. Dr. med.

- Virologie
  Klenk, Hans-Dieter Prof. Dr. med.

- Virologie Medizinische Mikrobiologie
  Radsak, Klaus Prof. Dr. med.

- Virologie und Zellbiologie
  Maisner, Andrea Dr. rer. physiol.

- Zell- und Reproduktionsbiologie
  Aumüller, Gerhard Prof. Dr. med.

  Seitz, Jürgen Prof. Dr. rer. nat.

- Zellbiologie und Biochemie
  Konrad, Lutz PD. Dr. rer. nat.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Das Wachstum experimentell erzeugter, intrazerebral verimpfter Gliome im MR-Tomographen bei Rattenn“ im InstitutHiermit erkläre ich eidestattlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Das Wachstum experimentell erzeugter, intrazerebral verimpfter Gliome in der Magnetresonanztomographie bei Ratten“ im Medizinischen Zentrums für Pathologie der Philipps-Universität Marburg Abteilung für Neuropathologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. H. D. Mennel mit Unterstützung durch Boris Keil und Johannes Heverhagen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und auslämdischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen

- Acta Neuropathol 104 (2003) 543-581
- Experimental and Toxicologic Pathology 56 (2004) 25-35 veröffentlicht.

Marburg, den 20.09.2005

Nils Kosse

11 Danksagung

Erst einmal möchte mich ganz besonders bei meinen Eltern, Ellen und Walter und meinen Brüdern, Jens und Tim bedanken, die mit ihrer ständigen Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke euch.

Bedanken möchte ich mich auch bei Boris Keil, Johannes Heverhagen, Ralf Jäger, Horst Hahn, Petra Liske, Christiane Striepecke, Ruth Waßmuth, Verena Dippel, Ginette Bortolussi und Heike Geißel, die alle auf ihre Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben und mir damit zu einem erfolgreichen Abschluss verhalfen. Vielen Dank und viel Erfolg für die Zukunft.

Zum Schluss möchte ich noch ganz herzlich meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Hans-Dieter. Mennel, für seine Hilfe, Geduld, großen Unterstützung und für die Überlassung des sehr interessanten Themas danken und wünsche ihm alles Gute für seinen neuen Lebensabschnitt.