

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. K. Roosen

Spontane Regression experimenteller Gliome – Vergleich des Spontanverlaufes  
intracerebraler Gliome bei immunkompetenten und thymektomierten Ratten anhand  
immunhistologischer und MRT-Studien im Rahmen der  
C6- Gliomsphäroidimplantation

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Sabine Hildebrandt  
aus Weiden i.d.Opf.

Würzburg, Januar 2004

Referent: Prof. Dr. K. Roosen

Koreferent: Prof. Dr. W. Roggendorf

Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2004

Die Promovendin ist Ärztin

## **Meinen Eltern**

## Inhalt

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Tumoren des zentralen Nervensystems .....	1
1.1.1.	Definition und Epidemiologie .....	1
1.2	Glioblastoma multiforme .....	3
1.2.1.	Definition und Epidemiologie .....	3
1.2.2.	Pathologie.....	3
1.2.3.	Klinik und Diagnostik .....	5
1.2.4.	Therapie und Prognose .....	6
1.2.5.	Alternative Therapieansätze .....	6
1.2.5.1.	Temozolamid .....	6
1.2.5.2.	Gentherapie .....	7
1.2.5.3.	Anti- Angiogenese .....	7
1.2.5.4.	Immunologische Therapien .....	8
1.3.	Spontane Tumorregression .....	10
1.4.	Beschreibung des Tiermodells .....	11
1.4.1.	Historie und Anforderungen an Tiermodelle .....	11
1.4.2.	C6- Zellen .....	12
1.4.3.	C6 Gliomzellen im Tumorsphäroidmodell .....	13
1.5.	MRT im Rahmen des Tiermodells .....	14
1.6.	Tumorimmunologie .....	14
1.7.	Zielsetzung .....	16
<b>2.</b>	<b>Geräte, Materialien und Chemikalien .....</b>	<b>17</b>
2.1.	Geräte und Laborhilfen .....	17
2.2.	Verbrauchsmaterialien .....	18
2.3.	Chemikalien .....	18
2.4.	Antikörper und Reagenzien für die Immunhistochemie .....	19
2.5.	Medikamente .....	19
2.6.	Puffer und Lösungen .....	19

2.7.	Reagentien für die Zellkultur .....	20
<b>3.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>22</b>
3.1.	Zellbiologische Methoden.....	22
3.1.1.	Monolayer-Zellkultur von C6 Wildtyp- Gliomzellen .....	22
3.1.2.	Einfrieren und Auftauen von C6-Gliomzellen .....	22
3.1.3	Anlegen von Tumorsphäroiden .....	23
3.1.4.	Beschichtung der Zellkulturflaschen und 24 Well Platten .....	24
3.2.	Tierversuche .....	24
3.2.1.	Implantation von Tumorsphäroiden .....	24
3.2.2.	Kernspintomographie .....	25
3.2.3.	Entnahme der Gewebeprobe .....	27
3.3.	Konventionelle Färbungen .....	27
3.3.1.	Hämalaun-Eosin Färbung .....	27
3.4.	Immunhistochemische Färbungen .....	28
3.4.1.	Färben von CD 31 Protein, CD 8 Protein und ED1 Protein mit Histostain® Kit .....	28
3.5.	Quantifizierung der Gefäßdichte, der zytotoxischen T-Zellen und der Makrophagen .....	29
3.6.	Statistische Auswertung .....	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
4.1	Sphäroidimplantation .....	30
4.2.	Die Rolle der Immunkompetenz im Hinblick auf die MRT- Morphologie.....	30
4.3.	Die Rolle der Immunkompetenz auf die Tumorumfänge MR- tomographisch gemessen .....	32
4.4.	Die Rolle der Immunkompetenz auf das Tumorumfangen gemessen an HE- Schnitten .....	32
4.5.	Ergebnisse der Immunhistochemie bei beiden	

	Rattenpopulationen .....	34
4.5.1.	Zytotoxische T-Zellen (CD 8- Färbung) .....	34
4.5.2.	Makrophagen (ED 1- Färbung) .....	35
4.5.3.	Gefäße (CD 31 – Färbung) .....	36
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>38</b>
5.1.	Tumor-Modelle <i>in vivo</i> .....	38
5.1.1.	Sphäroidimplantation als <i>in vivo</i> Modell .....	38
5.1.2	C6- Sphäroidimplantation .....	41
5.2.	spontane Tumorregression beim Menschen und im Tiermodell .....	41
5.3.	Immunologie der Tumoren .....	42
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>49</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

# 1. Einleitung

## 1.1. Tumoren des Zentralen Nervensystems

### 1.1.1. Definition und Epidemiologie

Tumoren des Nervensystems machen etwa 7-9% aller menschlichen Tumoren aus. Sie betreffen alle Altersstufen, v.a. auch Kinder, wobei sie unter den pädiatrischen Neoplasien nach Leukämien und extrakraniellen Lymphomen bezüglich der Häufigkeit an zweiter Stelle stehen [CITOW, 2001].

Die Inzidenz von Hirntumoren wird mit 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr geschätzt, die Prävalenz soll bei etwa 30-50 pro 100.000 Einwohner liegen [POECK, 1998, DAVIS, 2001]. Man unterscheidet zwischen hirneigenen oder primären Hirntumoren, die etwa 5% aller Tumorkrankheiten ausmachen, und Metastasen oder sekundären Hirntumoren, deren Ursprung außerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) liegt, und die etwa 3% aller Tumorkrankheiten ausmachen. Unter den hirneigenen Tumoren des ZNS, insbesondere des Großhirns, treten mit 4-5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr (ca. 40%) die Gliome am häufigsten auf [POECK, 1998].

Prinzipiell können sich Neoplasien in allen Abschnitten des Nervensystems und aus jedem Zelltyp entwickeln. Gliome entstehen aus der Glia, dem Stützgewebe des Hirnparenchyms, die zum Erhalt und zur Lebensfähigkeit der Nervenzellen beitragen. Sie haben neben der Stütz- und Ernährungsfunktion auch die Aufgabe, die Entwicklung, die Aufrechterhaltung der Signaltransduktion und den Schutz der Neuronen zu gewährleisten [KESSEL, 1998].

Die Gliome werden nach der Differenzierung ihrer glialen Ursprungszelllinie in astrozytäre Gliome, Oligodendrogliome, oligoastrozytäre Mischgliome, Ependymome und Tumoren des Plexus Choroideus unterteilt. Des Weiteren ist eine mikroskopische Unterteilung z.B. der astrozytären Gliome in fibrilläre, protoplasmatische, gemistozytische und gemischte Varianten möglich [BERLIT, 1999].

Die klassischen Malignitätsmerkmale wie infiltrativ-destruierendes Wachstum und Metastasierung gelten für Tumoren des ZNS nur eingeschränkt. Die Tumordinfiltration findet normalerweise nur im Hirnparenchym statt. Die Infiltration benachbarter Gewebe, wie Knochen und Dura, stellt die Ausnahme dar, wogegen die Metastasierung über den Liquor cerebrospinalis bei z.B. Medulloblastomen eine klinisch erhebliche Relevanz besitzt [SCHWEITZER, 2001].

Die Dignität eines intrakraniellen Tumors richtet sich nach dessen Anaplasiegrad. Eine allgemein gültige Klassifikation erfolgte durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) 1993.

Tabelle 1: WHO- Klassifikation astrozytärer Tumoren

WHO- Grad	WHO-Bezeichnung	Histologische Kriterien	Überlebenszeit (ca.- Angaben)
I	Pilozytisches Astrozytom	geringe Zelldichte mit gleichförmigen Zellen, keine atypischen Mitosen, keine Gefäßwandproliferation, bipolare, „piloide“ Zellen, Rosenthal- Fasern, eosinophile Körperchen	> 5 Jahre
II	Niedriggradiges Astrozytom	geringe bis mäßige Zelldichte mit Unregelmäßigkeiten in Größe, Form und Chromatingehalt der Kerne, einige typische Mitosen, keine Gefäßwandproliferation	5 – 8 Jahre
III	Anaplastisches Astrozytom	erhebliche Zelldichte mit mäßiger bis starker Zell- und Kernpolymorphie, zahlreiche,	2 – 5 Jahre

		teilweise atypische Mitosen, Gefäßwandproliferation möglich	
IV	Glioblastoma multiforme	hohe Zelldichte mit starker Zell- und Kernpolymorphie, Riesenzellen, zahlreiche atypische Mitosen und ausgedehnte Nekrosen, starke Gefäßwandproliferationen	9 Monate

( Tab.1) WHO- Klassifikation astrozytärer Tumoren nach KLEIHUES 1993

## 1.2. Glioblastoma multiforme (GBM)

### 1.2.1. Definition und Epidemiologie

Das Glioblastoma multiforme ist ein hochmaligner, glialer Tumor astrozytären Ursprungs (WHO-Grad IV). Der Häufigkeitsgipfel befindet sich zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr, wobei Männer beinahe doppelt so häufig als Frauen betroffen sind. Es ist der häufigste astrozytäre Tumor und macht 15-20% aller Hirntumoren aus [POECK, 1998]. Das Glioblastom kann unterschiedlichen biologischen Tumorgruppen angehören. Es kann sich aus einem Gliom niedrigerer Malignität (sog. sekundäres Glioblastom) entwickeln und jüngere Patienten mit einer geringfügig besseren Prognose betreffen. Oder, mit sehr kurzer klinischer Anamnese, als *de novo*- Glioblastom (primäres Glioblastom) des älteren Patienten mit ungünstiger Prognose auftreten [GOETZ, 2003].

### 1.2.2. Pathologie

Charakteristisch für das Glioblastoma multiforme sind makroskopisch das „bunte“ Schnittbild mit dem Auftreten zentraler Nekrosen und Einblutungen mit einer Pseudozystenbildung aufgrund von Kolloquationsnekrosen. Die makroskopisch schlechte Abgrenzbarkeit ist Folge der hohen Invasivität der Tumorzellen, die sich vorzugsweise entlang myeliner Strukturen ausbreiten. Eine Ausbreitung über das Corpus callosum zur

gegenseitigen Hemisphäre führt zur Bildung eines sogenannten Schmetterlingsglioms. Wird das Hirngewebe mit mindestens zwei Hirnlappen befallen, so liegt eine Gliomatosis cerebri vor. Typische Merkmale des Glioblastoms sind das infiltrative Wachstum und perifokale Ödem. Ebenso kommt es zu einer Verdrängung des Hirngewebes, zu einem erhöhten intrakraniellen Druck, zur Verlegung der venösen Abflusswege und zu Blutungen [ROTH, 1999].

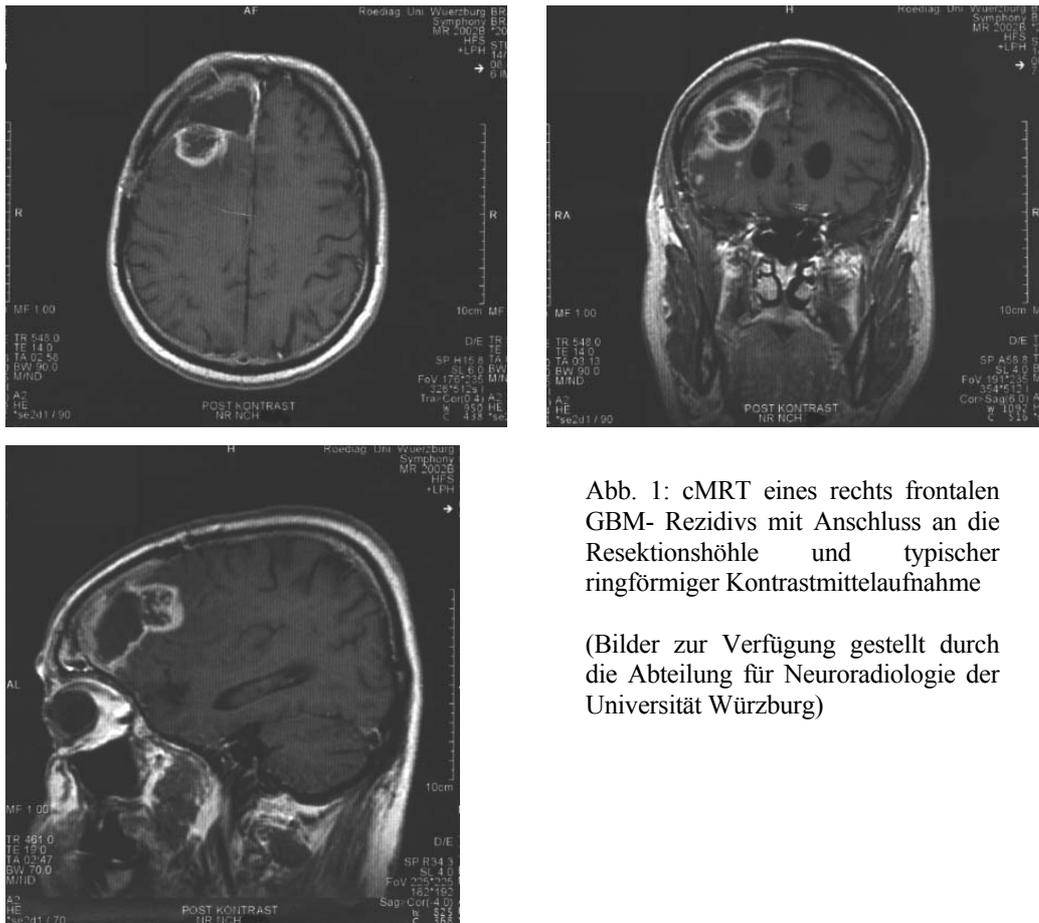


Abb. 1: cMRT eines rechts frontalen GBM- Rezidivs mit Anschluss an die Resektionshöhle und typischer ringförmiger Kontrastmittelaufnahme

(Bilder zur Verfügung gestellt durch die Abteilung für Neuroradiologie der Universität Würzburg)

Mikroskopisch ist das Glioblastom durch multiforme Zellen unterschiedlicher Größe und Form mit bizarren Kernen charakterisiert [BERLIT, 1998]. Außerdem sind Mitosen und flächenhafte oder strichförmige Nekrosen, um die sich die Tumorzellkerne radiär anordnen (Palisadenstellung der Kerne) typisch [KLEIHUES, 1995]. Des Weiteren sind Gefäßproliferate zu erwähnen, die u.a. durch ein von den Gliomzellen sezerniertes angiogenetisches Protein (VEGF, vascular endothelial growth factor) induziert werden.

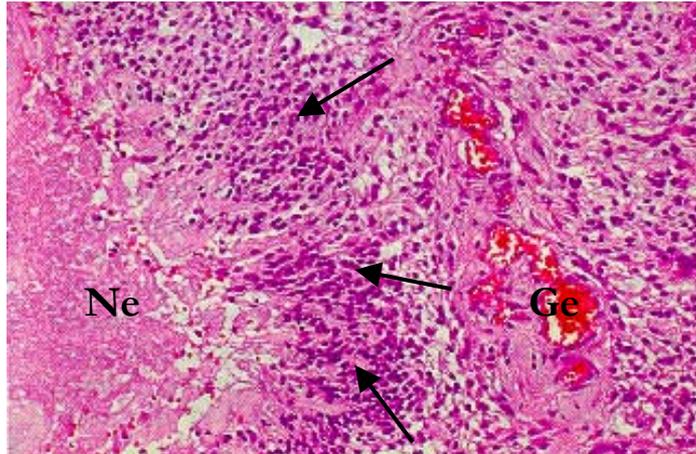


Abb. 2: H.E.-Färbung (200x) eines Glioblastoms: Bunt histologisches Schnittbild mit Nekrosen (Ne), palisadenartigen Tumorzellanordnungen (Pfeile) und Gefäßproliferaten (Ge).

### 1.2.3. Klinik und Diagnostik

Klinisch manifest werden Glioblastome häufig durch Zeichen erhöhten intrakraniellen Druckes, wie z. B. Kopfschmerzen, Sehstörungen, Nausea und Vomitus. Daneben kann je nach entsprechender Lokalisation der Tumor durch Gang- und Sprachstörungen, Wesensveränderungen, epileptische Anfälle und Gesichtsfeldeinschränkungen symptomatisch werden.

Klinische Symptome entwickeln sich innerhalb eines Zeitraumes von 3-5 Monaten, die mittlere Überlebenszeit beträgt ca. 9 Monate [PARNEY, 2000, SCHLEGEL, 1998].

Die Diagnostik der Wahl besteht in der kraniellen Computertomographie (CCT) nach Kontrastmittelgabe, da sich dabei typische Anreicherungen mit girlandenartigen Ringstrukturen erkennen lassen. Die Magnetresonanztomographie (MRT) erlaubt den meist genaueren Nachweis eines Glioblastoms, da eine exaktere Einschätzung der Tumoranteile, die Abgrenzbarkeit zwischen Tumor und Ödem und schließlich die Einbeziehung anatomischer Strukturen in den Tumorprozess möglich sind. An weiteren diagnostischen Möglichkeiten sei die Angiographie erwähnt, die bei der Klärung der Lagebeziehung zwischen Tumor und Gefäßsystem in der präoperativen Phase eine Rolle spielt. Die endgültige Diagnose erfolgt nach histologischer Untersuchung eines Biopsates oder Operationspräparates.

#### 1.2.4. Therapie und Prognose

Das aktuelle Therapieschema besteht in der möglichst radikalen Glioblastom- Resektion. Sollte die Tumorlokalisation und die Operationsfähigkeit des Patienten dies nicht zulassen, kann zumindest eine Teilreduktion des Tumors versucht werden. Die operative Resektion dient der Gewebegewinnung für eine histologische Diagnose, der Verringerung der Tumormasse und somit dem Senken des intrakraniellen Drucks. Dadurch schafft man eine bessere Ausgangssituation für eine adjuvante Therapie. Seit der BTSG- Studie ist die palliative Wirksamkeit einer externen Bestrahlungstherapie bei Glioblastomen nachgewiesen [WALKER, 1978]. Führt man eine postoperative Radiatio durch, so sind signifikant verlängerte Überlebenszeiten nachzuweisen [KRETH, 1993]. Als Standard gilt heute der multimodale Therapieansatz der Resektion und der perkutanen Strahlentherapie. Damit lassen sich Überlebenszeiten von 10-11 Monaten erreichen [LACROIX, 2001, LAWS, 2003].

Eine adjuvante Chemotherapie hat bislang nicht im erhofften Umfang dazu beigetragen, die Prognose des GBM wesentlich zu verbessern. Z.B. zeigten Wong et al., dass verschiedene Chemotherapeutika keinen nennenswerten Einfluss auf die Überlebenszeit von Gliompatienten erzielen konnten [WONG, 1999].

#### 1.2.5. Alternative Therapieansätze

##### 1.2.5.1. Temozolamid

Die bislang nicht befriedigenden Therapiemöglichkeiten verstärken das große Interesse an neuen Konzepten, wie z.B. dem Zytostatikum Temozolamid (Temodal®). Es ist ein gut oral bioverfügbares Derivat der Dacarbazine und kann u.a. die Apoptose von Tumorzellen induzieren [D'ATRI, 1998]. Studien zeigen eine höhere mittlere Überlebenszeit mittels Temozolamide im Vergleich zu den Dacarbazinen [YUNG, 2000]. Dennoch ist es noch zu früh, Schlussfolgerungen daraus abzuleiten [BROWN, 2003].

### 1.2.5.2 Genterapie

Daneben ist die Genterapie als weiterer Ansatzpunkt für eine neue Therapiestrategie zu sehen [PARNEY, 2003]. Mittels der Genterapie versucht man durch gezielte Veränderungen des Erbgutes einer erkrankten Zelle einen therapeutischen Effekt zu erzielen [SCHLEGEL, 1997]. In den bisherigen Therapiestudien maligner Gliome gibt es zwei unterschiedliche Strategien zu unterscheiden: direkte und indirekte Genterapie. Die direkte Genterapie versucht z.B. durch das Adenovirus mittels Gentransfer sogenannte Tumorsuppressorgene zu ersetzen. Also Gene, die den Tumor unterdrücken, aber in den Tumorzellen verlorengegangen sind. Die zweite Möglichkeit der direkten Genterapie besteht in der Ausschaltung übermäßig aktivierter Onkogene (z.B. Wachstumsfaktoren). Die indirekte Genterapie korrigiert keine zellulären Fehlfunktionen, sondern verändert Tumorzellen, damit sie Vorstufen von chemotherapeutischen Substanzen spezifisch intrazellulär aktivieren und abtöten können. Vorreiter dieser Therapie ist die VDEPT, virus directed enzymatic prodrug therapy [CULVER, 1992]. Abschließend ist zu sagen, dass es noch zu früh für Aussagen über die Wirksamkeit dieser Therapieform ist. Nichtsdestoweniger ist dies ein interessanter Therapieaspekt, der eine Vielzahl an Forschungsmöglichkeiten bietet [FINE, 1995].

### 1.2.5.3 Anti- Angiogenese

Folkman beschrieb 1971, dass ein Tumor sich mit Gefäßen versorgen muss, um an Größe zuzunehmen. Diese These stellt die Grundlage der anti-angiogenen Krebstherapie dar. Dies macht klar, dass die Vaskularisation maligner Gliome einen weiteren Therapieansatzpunkt darstellt [FOLKMAN, 1971]. Des Weiteren folgerte Folkman, dass sich Tumoren eines angiogenen Stimulus bedienen müssen, um sich mit neuen Gefäßen zu versorgen. Inzwischen wurde eine Vielzahl pro- und anti-angiogenetischer Substanzen gefunden. VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) stellt den Faktor mit der höchsten Konzentration in Tumoren dar [PLATE, 1999]. VEGF ist ein Endothelzellmitogen, das über Endothelzellproliferation, -aktivierung und -migration zu einer Regulation der Angiogenese führen kann. Eine geringe Menge an VEGF ist für das Überleben und zur Funktion jedes Gefäßnetzes nötig. Die Blockade von VEGF-Rezeptoren ist als Therapieansatz der Tumorbekämpfung zu sehen. Daneben besteht die

Möglichkeit, Endothelzellen direkt anzugreifen. So scheinen Angiostatin und Endostatin geeignet zu sein, die Gefäßversorgung von Tumorzellen zu verschlechtern, indem sie ihre Wirkung nur auf Endothelzellen entfalten können. Angiostatin hemmt die Proliferation und induziert die Apoptose dieser Zellen. Endostatin erhöht die Apoptoserate in Endothelzellen. Daneben sind Matrixmetalloproteinasen (MMP) in Gliomen von Bedeutung [VINCE, 1999, 2001]. Die Hemmung dieser Proteinasen hemmt die Migration der Endothelzellen. Für den MMP- Hemmer Marimastat konnten zwar positive Effekte gezeigt werden, aber eine Verbesserung der Überlebensrate bei Gliomen konnte noch nicht nachgewiesen werden [STEWART, 2000].

Neben den beschriebenen Substanzen werden noch eine ganze Reihe anderer in der anti-angiogenen Tumorthherapie bei Gliomen eingesetzt. Es müssen aber noch endgültige Ergebnisse abgewartet werden. Dennoch scheint klar, dass die anti-angiogene Tumorthherapie in den kommenden Jahren bei verschiedenen Malignomen eine große Rolle in der Klinik spielen könnte [NELSON, 1998, GRADISHAR, 1997].

#### 1.2.5.4. Immunologische Therapien

Schließlich bleibt zu erwähnen, dass die humorale und zellvermittelte Immunität in Gliompatienten verringert ist. Alle bisherigen Gehirntumorbehandlungen aus Operation, Bestrahlung, Chemotherapie, sowie die Unterstützung durch Steroide (Hirnödemtherapie) schwächen das Immunsystem deutlich

Die bisherige Lehrmeinung, dass sich das Gliomwachstum in einer „immunologischen Nische“ abspielt, führte zu Überlegungen über eine Stimulation des Immunsystems, um die Immuntherapie neben Operation und Strahlentherapie als weitere Behandlungsmethode zu etablieren [TONN, 1997]. In diesem Zusammenhang sind mehrere Therapiemöglichkeiten zu nennen: Immunstimulation, aktive, adoptive und passive Immuntherapie, sowie die genetische Modifikation.

Mit der Immunstimulation erhofft man eine Stärkung des Immunsystems des Patienten, um eine Immunantwort gegen den Tumor zu induzieren. In der Tumorbekämpfung wird mittels Thymushormonen, Leukozytenextrakten, Interferonen, Interleukinen sowie TNF $\alpha$  versucht, eine Verbesserung der Immunstimulation zu erreichen. Nach klinischen

Versuchen konnten keine therapeutisch relevanten Immunantworten gegen diese Stoffe festgestellt und kein Effekt auf die Tumorreduktion nachgewiesen werden [ZINKERNAGEL, 1997, LAMPSON, 1997].

Diese aktive Immuntherapie versucht durch aktive Immunisierung eine protektive Immunität gegen neoplastische Zellen zu induzieren. Eine Methode besteht in der Injektion abgetöteter oder bestrahlter Tumorzellen. Dieses Vorgehen gründet auf der Überlegung, mit antigenhaltigen Tumorzellen eine Immunantwort und Lymphozytenaktivierung auszulösen. Die bisherigen Versuche enttäuschten. Die reinjizierten tumor-assoziierten Antigene führten nicht zu einer signifikanten Immunantwort.

Als adoptive zelluläre Immuntherapie bezeichnet man den Transfer in vitro kultivierter Immunzellen mit Anti-Tumor-Reaktivität in einen immunsupprimierten Empfänger. T-Zell- Effektorklone oder –Populationen werden in vitro mittels Antigenstimulation vermehrt (lymphokinaktivierte Killerzelle, LAK- Zellen) und dann zurücktransfundiert. Neueste klinische Versuche mit malignen Gliomen haben sich auf die intratumorale Anwendung von LAK- Zellen konzentriert. LAK- Zellen werden durch die Inkubation von peripheren Blut-Lymphozyten mit IL-2 hergestellt und bewirken eine zytolytische Aktivität gegen Tumoren und greifen normales Hirngewebe nicht an [ROTH, 1999].

Eine Möglichkeit der passiven Immuntherapie besteht in der Verwendung von Antikörpern, die an Antigene auf der Oberfläche neoplastischer Zellen binden. Die Antikörper dienen als Vehikel für toxische Substanzen und damit zur selektiven Elimination neoplastischer Zellen.

Das Konzept über monoklonale Antikörper eine selektive Tumorbehandlung durchzuführen setzt die Generierung eines tumorspezifischen Antikörpers voraus. Dieser soll nicht mit „normalen“ Zellen kreuzreagieren. Ein solcher hochspezifischer Antikörper ist für Gliome noch nicht gefunden worden. Zellen maligner Gliome weisen eine ausgeprägte Antigen- Heterogenität auf, so dass es nicht wahrscheinlich erscheint, dass ein einzelner Antikörper ausreicht [ROTH, 1999].

Im Rahmen der genetischen Modifikation fand eine molekularbiologische Studie statt, in der Mäuse- cDNA in ein zytotoxisches T-Lymphozyten-Genom inseriert wurde. Das Ergebnis war die gesteigerte Ausschüttung von Interferon und die verminderte Zytotoxizität von Gliomzelllinien. Dieser Versuchsansatz steckt noch in den Anfängen und lässt somit keine Schlussfolgerung auf seine Wirksamkeit zu [GREENBERG, 1999].

Diese Ausführungen machen deutlich, dass die Prognose des Glioblastoms insgesamt noch nicht entscheidend verbessert werden konnte.

### 1.3. Spontane Tumorregression

Neben den oben erwähnten „klassischen“ klinischen Verläufen und unabhängig von sämtlichen Therapieversuchen sind in der Literatur wenige Fälle der spontanen Tumorregression beschrieben. Diese ist definiert, als das teilweise oder vollständige Verschwinden eines Neoplasmas ohne Behandlung. Die spontane Regression von humanen Tumoren ist sehr selten und betrifft höchst immunogene Tumoren [PAPAC, 1998]. Sie schließt auch Therapien mit ein, bei denen ein signifikanter Einfluss auf die systemische Tumorerkrankung nicht zu erwarten ist. Dies kann z.B. eine palliative Gabe von Steroiden beinhalten [HIROSE, 1998]. Des Weiteren bedeutet spontane Regression nicht, dass die systemische Krankheit geheilt oder die Regression von Dauer ist [BODEY, 2002]

Sie konnte bei Gliomen des Nervus Optikus [PARSA, 2001, ZUCCOLI, 2001] und der Pons [LENARD, 1998], bei verschiedenen Astrozytomen [KERNAN, 1998, ZIZKA, 2000], primären cerebralen Lymphomen [AL-YAMANY, 1999], sowie Tumoren anderer Organe nachgewiesen werden. Vergleichsweise häufig tritt dieser klinisch bemerkenswerte Verlauf im Rahmen von Phakomatosen, wie z.B. der Neurofibromatose Typ I [GOTTSCHALK, 1999] auf.

Die zellbiologischen Mechanismen, die diese Tumorabstoßungsreaktion bedingen, sind heute noch weitgehend unbekannt. Wie oben bereits erwähnt, liegen diesem Phänomen zahlreiche verschiedene Mechanismen zu Grunde. Einige dieser Mechanismen nutzbar zu machen, würde einen entscheidenden Vorteil in der Therapie maligner Gliome mit sich bringen.

#### 1.4. Beschreibung des Tiermodells

##### 1.4.1. Historie und Anforderungen an Tiermodelle

Tiermodelle gelten seit den frühen 70iger Jahren als adäquate Möglichkeit die Wirksamkeit neuer Therapieansätze in der Behandlung von Gehirntumoren zu erforschen. Tiermodelle dienen in erster Linie der Untersuchung der Mechanismen der Tumorentstehung, Progression, Angiogenese und Metastasierung, sowie in zweiter Linie der Erforschung verschiedener Therapieformen [BARTH, 1998]. Neben Katzen und Hunden finden Ratten am häufigsten in Tiermodellen Anwendung. Peterson beschrieb, dass die Versuchstiere möglichst klein und günstig zu unterhalten sein sollten, damit auch größere Mengen für die Versuchsreihen zur Verfügung stehen [PETERSON, 1994]. Seit Mitte der 70iger Jahre wurden Ratten intensiver zu Versuchszwecken in der Gehirntumorforschung untersucht, da sie u.a. diese Anforderung erfüllen. Im Folgenden wird v.a. auf Rattentiermodelle eingegangen. Die Ausgangsstudien bezogen sich auf die intravenöse Injektion von z. B. N-Methyl N- Nitrosoharnstoff, womit man die Induktion von Tumoren im zentralen Nervensystem erreichte [DRUCKREY, 1964]. Diese Studien führten zu einer Anzahl von Gehirntumormodellen, die gut charakterisiert, einfach reproduzierbar und applizierbar sind. Auch wenn sicherlich kein Tiermodell das humane Gehirntumorwachstum exakt simulieren kann, sollte es möglichst nahe an die Situation des menschlichen Tumors heranreichen.

Folgende Anforderungen sind an Gehirntumormodelle zu stellen: Die Tumorzellen sollten von glialen Zellen abstammen. Daneben sollte die Wachstumsrate des Tumors, genauso wie die malignen Charakteristika vorhersehbar und reproduzierbar sein. Außerdem sollten sie Gliom- spezifische Merkmale, wie invasives Wachstum, Neovaskularisation und Veränderungen der Blut- Hirn-Schranke besitzen. Das Tumorwachstum sollte lange genug andauern, um Therapiestudien und Qualitätskontrollen (Auswertungen der Wirksamkeit) zu erlauben. Die Minimierung immunologischer Zusammenhänge und die Möglichkeit der Überwachung des Tumorwachstums gehören ebenso zu den Anforderungen an die Tiermodelle [PETERSON, 1994]. Tiermodelle sollten möglichst viele der hier erwähnten Anforderungen erfüllen. Je nach Fragestellung wird das Modell ausgewählt.

Verschiedene Fälle extrazerebraler Tumorlokalisation zeigten ein fehlendes invasives Tumorwachstum, welches die Prognose der Patienten bestimmt. Das invasive Wachstum menschlicher Gliome ist das Ergebnis aus komplexen Interaktionen zwischen Gliomzellen und gehirnspezifischer extrazellulärer Matrix. Deshalb ist die orthotope Implantation (also die Implantation von Hirntumorzellen ins Hirngewebe) und das dortige Wachstum als wichtige Anforderung an Tiermodelle zu erwähnen [GOLDBRUNNER, 2000b]. Aufgrund des zeitaufwendigen und komplizierten Vorgangs der Tumorimplantation in das Gehirn, gibt es nur wenige Studien über orthotope Modelle in der Erforschung des Gliomwachstums.

#### 1.4.2. C6- Zellen

Durch wiederholte Behandlung mit N-Methyl N- Nitrosoharnstoff (MNU) gelang es erstmals Benda und Schimek einen sogenannten C6- Tumor herzustellen [BENDA, 1971]. C6- Zelllinien werden häufig in Gliomstudien verwendet [NAGANO, 1993, BARTH, 1998]. Die C6- Zelllinie beinhaltet astrozytische Kennzeichen und wird in neurobiologischen Studien wegen des Vorkommens von glialen Zellmarkern, wie z.B. GFAP (glial fibrillary acidic protein) und S- Protein untersucht. Es findet eine Untersuchung in *in vivo* und *in vitro* Transplantationsmodellen statt. Ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zeigt sich im Hinblick auf verschiedene Rattenpopulationen. So fällt ein zu humanen Gliomen homologes Wachstum bei der Implantation in Wistarratten auf. Diese wiesen eine parenchymatöse Invasion, Neovaskularisation und Nekrose auf [BENDA, 1971].

Da die C6 Zellen in einem Wistar- Auszuchtstamm generiert wurden, ist es nicht möglich diese in einen syngeneten Wirt zu implantieren. Das heißt, der Wirt, aus dem der Tumor generiert wurde, steht für eine Implantation nicht zur Verfügung. Die Tumorzellen müssen folglich in Tiere implantiert werden, von denen eine gewisse Abstoßungsreaktion gegenüber den Gliomzellen von vornherein zu erwarten ist. Dies stellt eine bedeutende Einschränkung in der Validität von Überlebenszeitstudien dar, da der Tumor eine ausgeprägte immungene Wirkung in allogenen Wirten aufweisen kann [BARTH, 1998].

#### 1.4.3. C 6 Gliomzellen im Tumor- Sphäroidmodell

Sphäroide sind kugelförmige Tumorzellaggregate, die aus Zelllinien und aus Gewebeproben hergestellt werden. Dreidimensionale Sphäroide aus Gliomzellen ähneln soliden Tumoren, indem sie einen natürlichen Aufbau ihrer extrazellulären Matrix aufweisen und ihre Wachstumsgeschwindigkeit der anderer Neoplasien ähnelt. Die Implantation eines solchen Sphäroids in das passende Zielgewebe ermöglicht die Bildung eines kleinen Tumorherdes. Diese Methode wird z.B. bei der Implantation von Sphäroiden genutzt, die aus C6-Rattengliomzellen gewonnen werden [FARRELL, 1988, GOLDBRUNNER, 1999, PARSA, 2000]. Aus den implantierten neoplastischen Zellen entsteht ein schnell wachsender Tumor mit vielen Eigenschaften des Glioblastoma multiforme. Die Vorteile dieses Systems bestehen einerseits in der dreidimensionalen Struktur des Primärtumors, der leichten Reproduzierbarkeit und der definierten Tumormasse [FARRELL, 1987]. Die genaue Positionierung des Sphäroids im Wirtsgewebe stellt einen großen Vorteil gegenüber der stereotaktischen Implantation von Zellsuspensionen dar, da hierbei nicht immer ersichtlich ist, wie weit sich die Zellen von der primären Läsionsstelle entfernen und anwachsen. Die Nachteile sind dagegen im Implantationsaufwand und im Setzen einer großen Wunde zu sehen. Das Sphäroidmodell ähnelt den physiologischen Gegebenheiten *in vivo*. Kultiviert man Zellen dagegen als Monolayer, so entspricht das nur begrenzt den Eigenschaften eines dreidimensionalen Tumors, da die Zellen weitgehend die gleichen Bedingungen vorfinden. Die Zellen eines dreidimensionalen Tumors dagegen sind einem unterschiedlichen Angebot an Sauerstoff und Nahrungsstoffen sowie physischen und chemischen Stress in unterschiedlicher Stärke ausgesetzt [SANTINI, 1999]. Dies hat großen Einfluss auf die Morphologie der Gewebsneubildung, da in Bereichen schlechter Sauerstoffversorgung Zellschäden und Nekrosen auftreten können [FOLKMAN, 1971]. Das Sphäroidmodell dient auch als Grundlage für die Beobachtung des Tumorwachstums. Dieses wird mittels MRT-Technologie über einige Tage verfolgt [GOLDBRUNNER, 2000a]. Eine derartige Beobachtung über einen längeren Zeitraum fand bis jetzt noch nicht statt.

Bereits in der Vergangenheit wurden immunsupprimierte Versuchstiere verwendet [SARIS, 1984]. So implantierten Rana et al. 1977 [RANA, 1977] menschliche Glioblastomzellen in 3 thymektomierte Mäuse. Die Tumoren wuchsen in allen Mäusen

und entwickelten morphologische Merkmale der Ausgangsspezies. Die Gruppe um Saini [SAINI, 1999] stellte einen morphologischen Vergleich zwischen C6- und 9L –Zelllinien in immunkompetenten und immunsupprimierten Ratten an. In immunkompetenten Wistar Ratten zeigten sich die 9L- Gliome demarkiert und weniger infiltrativ als in immunsupprimierten Nacktratten. Hier zeichneten sich die implantierten Tumoren, wie bei den C6- Gliomen, durch ein multiformes und infiltratives Wachstum aus. Bei 9L-Zellen handelt es sich um Gliomzellen mit ausgeprägter sarkomatöser Komponente und entsprechender Immunogenität [BARKER, 1973, BLUME, 1974]. Zusätzlich kommt auch die Tatsache, dass C6-Zellen in einem Wistar- Auszuchtstamm generiert wurden und keinen syngeneten Wirt zur Verfügung haben bei diesen Untersuchungen zum Tragen.

#### 1.5. MRT im Rahmen des Tiermodells

Lange Zeit stellte die histologische Aufarbeitung eines Tumorgewebes den Abschluss einer Tiermodellstudie, z.B. im Hinblick auf die Invasion des Tumors dar. Der Gedanke, das Tumorstadium mittels der MRT- Bildgebung zu beobachten ist nicht neu [BEDERSON, 1986]. In den letzten Jahren allerdings führten technische Fortschritte dazu, die MRT- Technik zur nicht- invasiven Darstellung von Gehirntumoren in Ratten zu verwenden [BENDSZUS, 2002]. Des Weiteren ermöglichen spezielle Softwareprogramme eine Volumenanalyse von intrazerebralen Tumoren [RAILA, 1999]. Tumorstadiummessungen *in vivo* können nun wesentlich einfacher durchgeführt werden [DENNIE, 1998]. In vielen Arbeitsgruppen hat die MRT- Bildgebung einen bedeutenden Stellenwert bei *in vivo* Verlaufskontrollen intrazerebraler Gliome in Ratten erlangt [GOLDBRUNNER, 2000 a, b].

#### 1.6. Tumorummunologie

Das zentrale Nervensystem (ZNS) gilt als “immunologisch privilegiert“ [MEDAWAR, 1948]. Neben der Vorderkammer des Auges, der Schilddrüse und dem Hoden gehört es zu den Organsystemen, die kein lymphatisches System aufweisen. Ein wichtiger Faktor, der zur Regelung einer Immunantwort im Gehirn beiträgt ist die Blut-Hirnschranke. Sie verhindert den Eintritt von Entzündungszellen und immunregulierenden Molekülen in das Gehirn. Nur Wasser und kleine, inerte und lipophile Moleküle mit einem Molekulargewicht bis zu 200 Dalton können passiv die Blut-Hirnschranke durchwandern. Für

Immunglobuline (Ig) und Zytokine ist die intakte Blut-Hirnschranke nicht durchgängig [GREENBERG, 1999]. Zytokine sind biologisch aktive Hormone, meistens Glykoproteine, die auf Zellen mit entsprechenden Rezeptoren verschiedenste biologische Effekte ausüben [ZINKERNAGEL, 1997], z.B. die Vermittlung von Abwehrreaktionen bei bakteriellen Infekten.

Gliome führen im Gehirn zu einer immunologischen Reaktion. Studien zeigen, dass Gliompatienten eine beeinträchtigte zelluläre Immunantwort und eine reduzierte T-Zell-Aktivität aufweisen. Außerdem besteht eine kutane Anergie, eine reduzierte Aktivität von „Natural-killer“- (NK) Zellen sowohl einer verminderten IL-2-Produktion von mitogenaktivierten T-Zellen [TONN, 1997]. IL-2 wird v.a. von T-Zellen produziert und ist als T-Zell-Wachstumsfaktor für die Proliferation der T-Zellen zuständig. Für die Erklärung dieser Phänomene wurden bislang 2 Zytokine, die in Gliomen gebildet werden, verantwortlich gemacht: TGF- $\beta$ 2 (Transforming growth factor  $\beta$ ) und Prostaglandin E2 (PGE2). TGF- $\beta$ 2 wird von Gliomzellen sezerniert und es zeigt sich eine steigende Expression bei Zunahme des Anaplasiegrades des Glioms. TGF- $\beta$ 2 unterdrückt die T-Lymphozytenaktivität in malignen Gliomen [GREENBERG, 1999]. Darüber hinaus wurde auch die IL-10-Produktion bei Gliompatienten erhöht gefunden. IL-10 behindert die Synthese einer Reihe anderer Zytokine, einschließlich IL-1, Interferon (INF- $\alpha$ ), TNF und IL-6, die für die T-Zell- und Makrophagenaktivierung zuständig sind [PARNEY, 2000].

Gehirntumorzellen besitzen Antigene (Ag), die im Zytoplasma oder auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Tenascin, ein gliom-spezifisches Antigen, wird auf der extrazellulären Oberfläche des Glioms exprimiert [KURPAD, 1995]. Außerdem ist Mel-14 ein neuroektodermales Antigen, das neben Melanomen, Neuroblastomen auch in Gliomen nachweisbar ist. Gegen diese beiden Antigene wurden monoklonale Antikörper entwickelt und mit Iod 131(131I) behandelt für die Tumorlokalisierung und Behandlung eingesetzt [GREENBERG, 1999]. Mit der Induktion einer Immunantwort gegen tumorantigenpräsentierende Zellen ist die Hoffnung verbunden, die spezifische Bekämpfung maligner Zellen zu bewirken, während das normale Gewebe unberührt bleibt [PROESCHOLDT, 2001].

## 1.7. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit fand eine systematische Analyse der spontanen Regression experimenteller Gliome statt. Um die Wertigkeit des etablierten und weit verbreiteten C6-Implantationsmodells zu spezifizieren, prüften wir den grundlegenden Einfluss der Immunkompetenz auf dieses Modell. Dies geschah im Rahmen des Vergleichs des Spontanverlaufs intracerebraler Gliome bei immunkompetenten und thymektomierten Ratten.

Für unsere Versuche wurde folgende Hypothese erarbeitet:

Mittels dieser Versuchsreihe fand eine längere Beobachtung (bis zu 72 Tage) des Tumorwachstums mittels eines C6- Sphäroidmodells statt. Anhand dieser Untersuchung kann der zeitliche Verlauf des Tumorwachstums und sein Einfluss auf die Tumormorphologie untersucht werden.

Dafür werden den Versuchstieren orthotop Zellsphäroide implantiert, wobei es sich um C6-Gliomwildtypzellen handelt. Die Tumolvolumina wurden an definierten Terminen magnetomographisch gemessen. Nach den jeweiligen MRT-Terminen wurde eine bestimmte Anzahl repräsentativer Tumorproben entnommen. Dabei maß man einerseits per Lichtmikroskop die jeweilige Tumorgöße, andererseits fanden immunhistochemische Färbungen statt. Hierbei standen die CD 8 (zytotoxische T-Zellen)- und die ED 1 (Makrophagen)-Färbung im Vordergrund. Daneben wurden die Gewebeproben auf die CD 31- Gefäßdichte untersucht. Mögliche immunologische Einflüsse auf die Wirt-Immunantwort wurden anhand des Vergleichs zwischen dem Tumorwachstum thymektomierter und immunkompetenter Ratten in Betracht gezogen.

## 2. Geräte, Materialien und Chemikalien

### 2.1. Geräte und Laborhilfen

Biofuge Pico	Heraus Instruments, Hanau
Brutschrank (IR Autoflow CO <sub>2</sub> Water-Jacketed Incubator)	Nuaire, Plymouth, U.S.A.
Hohlmeißelzange FO 409	Aesculap, Tuttlingen
Instrumente mikrochirurgische	Aesculap, Tuttlingen
Kopfhalter	Werkstatt Neurologie, Universität Würzburg
Kryostat	Leica, Wetzlar
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph, Schwabach
Magnetrührstäbchen, div. Grössen	Heinse und Ziller, Würzburg
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Hanau
Messzylinder, div. Volumina	Schott, Mainz
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop, Wilovert	Hund , Wetzlar
Mikrowellenherd R-2V26	Sharp, Hamburg
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Operationsmikroskop OPMi II	Zeiss, Oberkochen
PH-Meter 525	WTW, Weilheim
Pipetten, Glas, 5, 10, 20 ml	Hartenstein, Würzburg
Pipettor (Stripettor)	Costar, Bodenheim
Skalpell „Cutfix“	B.Braun, Melsungen
Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, U.S.A.
Wärmeplatte	Medex, Kiel
Waage Sartorius BP 300 S	Sartorius, Göttingen

Wasserbad

Hartenstein, Würzburg

## 2.2. Verbrauchsmaterialien

Cryoröhrchen

Nalgene, Brüssel

Deckgläser

Hartenstein, Würzburg

Einmalkanülen, div. Größen

B.Braun, Melsungen

Einmalspritzen, div. Größen

B.Braun, Melsungen

Faltenfilter

Schleicher und Schüll, Dassel

Farbfilme

Agfa, Leverkusen

Histowachs

Cambridge Instruments, Nussloch

Hautklammergerät

B.Braun, Melsungen

Objektträger

Hartenstein, Würzburg

Pasteurpipette

Samco, San Fernando, U.S.A.

Petrischalen

Becton Dickinson, Oxuward; U.S.A.

Pipettenspitzen, Kunststoff, 10, 100, 1000  $\mu$ l

Greiner, Würzburg

Tubes, Kunststoff, 15, 50 ml

Becton Dickinson, Oxuward, U.S.A.

Zellkultur-24-Well-Platten

Costar, Bodenheim

Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>)

Costar, Bodenheim

## 2.3. Chemikalien

Aceton

Roth, Karlsruhe

Agar Noble

Nordwald, Hamburg

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Roth, Karlsruhe

Einschlussmittel für mikroskopische OT

Zymed, San Francisco, U.S.A.

Eosin

Merck, Darmstadt

Ethanol absolut (EtOH)

J.T.Baker, Deventer, NL

Methanol (MetOH)

J.T. Baker, Deventer, NL

Natriumchlorid

Merck, Darmstadt

Isotonische Kochsalzlösung (NaCl)

Braun, Melsungen

Natriumcitrat

Merck, Darmstadt

Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Tissue Tek	Saluna, Torrance, U.S.A.
Wasserstoffperoxid, 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim

#### 2.4. Antikörper und Reagentien für Immunhistochemie

CD 31	Santa Cruz, Santa Cruz, U.S.A.
CD 8	Santa Cruz, Santa Cruz, U.S.A.
ED 1	Serotec, Oxford, U.K.
Histostainkit	Zymed, San Francisco, U.S.A.

#### 2.5. Medikamente

Äther	Chinosol, Seelze
Magnevist <sup>®</sup> Gadolinium DTPA	Schering, Berlin
Ketamin Ketanest <sup>®</sup>	Parke-Davis, Berlin
Neo-Kodan Hautantiseptikum	Schülke und Mayer, Norderstedt
Rompun <sup>®</sup> Xylazin	Bayer, Leverkusen

#### 2.6. Puffer und Lösungen

##### Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

- 8 g NaCl
- + 0,2 g KCl
- + 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 12 H<sub>2</sub>O
- + 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

werden in 1000ml A.d. gelöst und auf ph 7,4 eingestellt.

## 2.7. Reagentien für die Zellkultur

Amphotericin B	Gibco-BRL- Life Technologies, Eggenstein
100x BME nicht essentielle Aminosäuren	Cytogen, Berlin
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 1g/ l Glucose	Cytogen, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS)	Bio Whittaker über Boeringer Ingelheim
Genetecin G 418	Gibco-BRL- Life Technologies, Eggenstein
L-Glutamin (200 mM in 0,85% NaCl)	Cytogen, Berlin
Penicillin (10000 U) / Streptomycin (10 mg/ ml)	Cytogen, Berlin
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Bio Whittaker über Boeringer Ingelheim
Trypsin-EDTA (0,05 M/ 0,02%)	Cytogen, Berlin
Ultra-reines Wasser (Seromed)	Biochrom, Berlin
100x MEM Vitamine	Gibco-BRL- Life Technologies, Eggenstein

### Zellkulturmedien

für C6 - Gliomzellen:

500 ml DMEM mit 1g/l Glucose  
60 ml FCS, hitzeinaktiviert  
6 ml Vitamine (= 1x)  
6 ml NEAs (= 1x)  
2 ml L-Glutamin (0,65mM)  
2 ml Penicillin (=32u/ml) / Streptomycin (=32mg/ ml)

Einfriermedium:

50 ml DMEM-Vollmedium mit 20% FCS  
40 ml FCS  
→ Lagern bei 4°C  
bei Gebrauch 9 ml mit 1 ml DMSO ansetzen.

( = 10 % DMSO und 50 % FCS)

Alle Medien und Zusätze werden, sofern nicht anders angegeben, mit einer Temperatur von 37°C verwendet. Die Medienzusätze werden aliquotiert bei –20°C aufbewahrt. Erst kurz vor Gebrauch werden sie aufgetaut und dann max. zwei Wochen bei 4°C gelagert.

### 3. Methoden

#### 3.1. Zellbiologische Methoden

##### 3.1.1. Monolayer-Zellkultur von C6 Wildtyp- Gliomzellen

Der erste Schritt besteht im Auftauen der C6 Wildtyp- Gliomzellen, die in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Man gibt diese Zellen unter sterilen Bedingungen in Zellkulturflaschen mittlerer Größe. Danach wachsen sie als Monolayer (Einzelzellschicht), wobei 15 ml des jeweiligen Zellkulturmediums als Nährstoffe dienen. Die Zellen inkubieren anschließend bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank.

Dabei handelt es sich um Standardbedingungen bei der Kultur der Gliomzellen, die auch bei allen anderen genannten Inkubationen Anwendung finden. Das Weiterverarbeiten der konfluenten, d.h. den Boden der Zellkultur vollständig bedeckenden Zellen, erfolgt durch Abnehmen und Verwerfen des Mediums. Darauf folgt das Spülen der Flasche mit 3ml vorgewärmten Trypsin EDTA. Die am Flaschenboden haftenden Zellen lockert man mit 1,5 ml Trypsin (unter genannten Inkubationsbedingungen). Nach kurzer Wartezeit (5 Minuten) und Beobachten des Lösungsvorganges unter dem Mikroskop kann man die restlichen, noch am Plastik haftenden, Zellen durch Klopfen lösen. Der nächste Schritt besteht in der Neutralisierung des Trypsins, in dem 8,5 ml des vorgewärmten Medium aufgenommen werden. Danach zieht man die gesamte Zellsuspension auf und gibt eine bestimmte Menge an Zellen wieder in die Zellkulturflasche zurück. Die Menge dieser Zellen hängt davon ab, wann eine mit Gliomzellen konfluent bewachsene Flasche z.B. zum Anlegen von Sphäroiden gebraucht wird. Je nach Bedarf kann man die restliche Zellsuspension auf andere Flaschen verteilen, einfrieren oder verwerfen. Schließlich wird die Zellkulturflasche mit Medium wieder auf 15 ml aufgefüllt.

### 3.1.2. Einfrieren und Auftauen von C-6 Gliomzellen

Überschüssige Zellsuspensionen oder Zelllinien, die für aktuelle Versuche nicht gebraucht wurden, können für den späteren Gebrauch eingefroren werden. Die Aufbewahrung erfolgt in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$ . Die Zellen werden trypsiniert, anschließend in kaltes Medium ( $4^{\circ}\text{C}$ ) (ad 10 ml) aufgenommen und bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 800 rpm 10 min ungebremst zentrifugiert. In der Zwischenzeit werden Kryoröhrchen beschriftet und das Einfriermedium mit DMSO auf Eis angesetzt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand des Zellpellets abpipetiert, verworfen und die Zellen in 1 bis 3 ml Einfriermedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wird zu je 1 ml pro Kryoröhrchen verteilt und umgehend auf Eis gestellt. Abschließend werden die Röhrchen für einen Tag bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert und danach in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie mehrere Jahre gelagert werden können.

Das Kryoröhrchen wird im  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad aufgetaut, bis noch ein kleiner Eisrest sichtbar ist. Anschließend gibt man den Inhalt des Kryoröhrchens in ein vorher beschriftetes 15 ml Tube. Danach wird das Röhrchen für 10 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 800 rpm zentrifugiert. Währenddessen wird eine Zellkulturflasche beschriftet und mit 10ml warmen Medium versehen. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand des Röhrchens abgekippt und verworfen. Das Pellet (Zellen, die am Boden des Zentrifugenröhrchens haften) wird mit Medium aufsuspendiert. Danach gibt man die Zellsuspension in die Zellkulturflasche, die sich bis zur Weiterverarbeitung im Brutschrank befindet.

### 3.1.3. Anlegen von Tumorsphäroiden

Gliomzellen haften am Boden von Zellkulturflaschen. Diese Adhäsion kann man durch vorheriges Beschichten der Flaschen mit Agar verhindern (coat). Dadurch können sich die Zellen nicht festsetzen und lagern sich statt dessen zu einem kugelförmigen, dreidimensionalen Zellverband, dem Sphäroid zusammen. Zum Anlegen dieser Kulturen werden die als Monolayer konfluent gewachsenen Zellen wie im Fall des Passagierens trypsiniert. 8 ml dieser Zellsuspension werden in eine beschichtete Kulturflasche gegeben, in die bereits 15 ml vorgewärmtes Medium vorgelegt wurde. Der Rest wird zum Umsetzen verwendet. Die Inkubation der Sphäroidflasche erfolgt

unter Standardbedingungen. Am folgenden Tag wird der Inhalt auf zwei frische, gecoatete Zellkulturflaschen verteilt. Die Flaschen werden dann wieder auf insgesamt 15 ml mit Medium aufgefüllt.

Nach vier Tagen haben viele der entstandenen Sphäroide eine Größe von 200-250  $\mu\text{m}$  erreicht und sie können vereinzelt werden. Unter sterilen Bedingungen werden sie mit einer Kolbenhub-Pasteur-Pipette unter Mikroskopsicht vereinzelt und auf gecoatete 24 Well Platten überführt. In einem einzelnen Well werden dafür mindestens 1,5 ml warmes Medium vorgelegt. Bei der Auswahl der Sphäroide für die folgende Implantation ist darauf zu achten, dass keine nekrotischen Exemplare ausgewählt werden. Diese können im Phasenkontrastmikroskop durch ihren dunkelgrauen bzw. schwarzen Kern erkannt werden. Sphäroide aus durchgängig lebenden Zellen haben keinen dunklen Kern; sie sind hell und durchscheinend.

#### 3.1.4. Beschichtung der Zellkulturflaschen und 24 Well Platten

Bei der für die Sphäroidkultur nötigen Beschichtung mit Agar (1% Agar in Medium, Verfahren nach Yuhas 1977) wird Agar-Noble verwendet. Dieser wird zu 10 ml Ultra-Pure-Water gegeben und bis zur vollständigen Lösung ca. 3 min in der Mikrowelle aufgekocht. Ist der Inhalt vollständig gelöst, so gibt man 40 ml Medium hinzu. Danach wird vorsichtig gemischt und schnell auf Zellkulturflaschen und Well-Platten verteilt. Um zu kaltes Medium zu vermeiden, ist es sinnvoll, das Zellkulturmedium ca. 10 min vor Beginn dieses Schrittes ins 37°C warme Wasserbad zu stellen. In eine 75 cm<sup>2</sup> Flasche gibt man 10 ml, in ein Well der 24 Well-Platte 1 ml Agar.

### 3.2. Tierversuche

#### 3.2.1. Implantation von Tumorsphäroiden

Der folgende Versuch wurde unter Projekt Nummer 621-2531.01-28/99 vom Ausschuss für Tierschutz der Universität Würzburg genehmigt. Als Tumorwirte wurden 16 immunsupprimierte Ratten des Typs Sprague-Dawley ausgewählt, die im Alter von 7 Tagen thymektomiert wurden. Des Weiteren wurden 16 immunkompetente Ratten des

gleichen Typs ausgewählt. Alle Tiere waren männlich und wiesen zum Zeitpunkt der Implantation ein Gewicht von 300 – 350 g auf. Die Ratten teilten sich zu viert einen Käfig und hatten eine Woche Zeit, sich vor der Operation an die Umgebung zu gewöhnen. Vor der Implantation wurden die Tiere mit 100mg/ kg KG Ketamin (Ketanest<sup>®</sup>) und 10 mg/ kg KG Xylazin (Rompun<sup>®</sup>) narkotisiert, die beide i.m. in den Oberschenkel injiziert wurden. Um Wundheilungsstörungen und Infektionen zu vermeiden, wurden der Kopf der Tiere rasiert und das Operationsgebiet mit Betaisodona<sup>®</sup> gespült. Danach wurde der Kopf der Tiere in einem Kopfhalter fixiert, und die Haut in sagittaler Richtung von etwas rostral der Augen bis in etwa Höhe der Ohren inzidiert. Der Schädel wurde im Bereich des Bregma mit der Diamantfräse unter fortlaufender Spülung trepaniert und die Dura offengelegt.

Um die Durchblutung der Duragefäße zu unterbinden, wurde diese nach ihrer Offenlegung im Bereich des Knochens entfernt. Die weiche Hirnhaut und Hirnrinde wurden mit einem Mikroskalpell in Form eines Halbkreises (2 mm) eingeschnitten und ein einzelner, frisch dem Medium entnommener, Sphäroid wurde unter Mikroskopsicht subkortikal in die Inzision plaziert.

Anschließend wurde das Bohrloch mit Knochenwachs verschlossen, um ein extrakranielles Tumorwachstum zu vermeiden.

Der Verschluss der Hautnaht erfolgte mittels Klammern. Für die gesamte Dauer der Narkose wurden die Tiere auf 37°C Wärmeplatten vor Auskühlung geschützt und erst nach dem Aufwachen in ihre Käfige zurückgebracht.

### 3.2.2. Kernspintomographie

Mit der Magnet-Resonanz-Tomographie ist ein Hinweis auf die Morphologie des Gewebes möglich. Die Wichtung des Bildkontrastes erfolgt durch physikalische Faktoren, wie z.B. der Protonendichte und den T1- und T2- Relaxationszeiten.

Auf T1-gewichteten Aufnahmen erscheinen Flüssigkeiten oder pathologische Strukturen signalarm (hypointens), während sie auf T2-gewichteten Aufnahmen signalreich (hyperintens) abgebildet werden. Des Weiteren ermöglicht die T2-Wichtung eine genauere Beurteilung des perifokalen Ödems sowie eine exaktere Abgrenzung des infiltrativen Wachstums des Tumors. Die Gabe von Kontrastmittel erlaubt es, durch

Charakterisierung der Bluthirnschrankenstörung und der dortigen Anreicherung solide Tumoranteile von Ödemzonen zu unterscheiden [POECK, 1998]. So kann das Signal aus dem Gewebe zudem durch die Gabe von Gadolinium DTPA (Prohance 0,1 ml/ kg) gesteigert werden, da es zu einer Verkürzung der Relaxationszeit kommt [THURN, 1998].

Die Kernspin-Untersuchungen fanden bei den thymektomierten Ratten am 7., 15., 21., 28., 35., 43., 58. und 72. Tag nach Implantation statt. Die nicht- thymektomierten Ratten wurden am 7., 12., 15., 19., 22., 29., 36., 42., 56. und 72. Tag nach Implantation MRT-technologisch auf das Tumorwachstum untersucht. Um die Auswertungen der MRT-Termine zu vereinfachen, wurden die Versuchstiere zu Gruppen zusammengefasst. So bilden die Ratten, die am 12-15. Tag nach Implantation getötet wurden Gruppe 1. Gruppe 2 setzt sich aus den am 19.-21. Tag explantierten Ratten zusammen. Gruppe 3 sind die Versuchstiere, die zwischen dem 28.-30. Tag nach Implantation starben. Gruppe 4 umfasst die Daten der Tiere, die zwischen den Tagen 35-48 Tag nach Implantation getötet wurden und die 5. Gruppe wird von den Tieren gebildet, die zwischen dem 49. und 72.Tag nach Implantation starben.

Dabei kam ein NMR-Tomograph (Siemens, Magnetom Vision<sup>®</sup>) mit einer Feldstärke von 1,5 Tesla zur Anwendung. Die Versuchstiere wurden vor der MRT-Untersuchung wie vor der Implantation narkotisiert. Die Ratten befanden sich in Rückenlage und der Kopf war in einem provisorischen Halter fixiert. Die Messung wurde in einer selbst angefertigten Spule mit einem Durchmesser von 30 mm durchgeführt. Die Messung bestand aus einer T2-gewichteten (T2-w) TSE Sequenz (TE 3000 ms, TR 96 ms, Schichtdicke 2 mm) und einer T1-gewichteten (T1-w) SE Sequenz (TE 460 ms, TR 14 ms, Schichtdicke 2 mm). Außerdem wurde bei allen Tieren eine CISS 3-D Sequenz (TE 12,2 ms, TR 5,9 ms, Schichtdicke 0,5 mm) durchgeführt. Die bei der CISS 3-D Sequenz gewonnenen Daten wurden mit Hilfe einer Workstation (Silicon Graphics<sup>®</sup>) und entsprechender Software (Siemens Virtuoso<sup>®</sup>) volumetrisch ausgewertet. Dies wurde erreicht durch manuelles Markieren des Tumors in jedem Schichtbild. Dafür waren eine genaue coronare, sagittale und axiale Ausrichtung der einzelnen Schichten nötig. Berechnet wurde das Volumen des Tumors schließlich aus der mittleren Fläche der Läsionen in coronarer, axialer und sagittaler Schnittrichtung.

Die Messungen wurden in Kooperation mit PD Dr. M. Bendzus, Abt. für Neuroradiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

### 3.2.3. Entnahme der Gewebeproben

Nach dem 12. Tag nach Implantation wurden nach jeder Kernspin-Untersuchungen 1-2 Versuchstiere noch unter Narkose durch intrakardiale Injektion von 50 mg/ kg Pentobarbital getötet. Ihre Hirne wurden mittels Skalpell und Hohlmeißelzange freigelegt. Der Tumor wurde dann zusammen mit dem zugehörigen Segment der ipsilateralen Hemisphäre entnommen. Die Gefrier (Kryo-) schnitte wurden durch Befestigen des Gewebsblöckchen mittels Tissue Tek<sup>®</sup> an einem kleinen Korkplättchen hergestellt. Danach wurde es in Isopentan, das mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird, schockgefroren und sofort in den -80°C Schrank überführt.

Von den in Kryo eingebetteten Gewebe wurden nach dem Schneiden 9µm dicke Schnitte angefertigt, die auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgenommen wurden. Diese wurden dann entweder für Hämatoxylin-Eosin- oder immunhistochemische Färbungen verwendet.

### 3.3. Konventionelle Färbungen

#### 3.3.1. Hämalaun-Eosin Färbung

Die Kryoschnitte wurden vor dem Färben ca. eine Stunde lang aufgetaut und getrocknet. Die Färbung mit Hämalaunlösung dauerte ca. 10 Min. Die Schnitte wurden anschließend mit Leitungswasser ca. zehn Minuten fließend gewässert. Nach Abstoppen der Reaktion in Aqua dest. wurde das Material ca. 25 Sekunden in 1% iger Eosinlösung gegengefärbt. Danach wurden die Schnitte nach Spülung in Aqua dest. in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70%, 96% sowie 100% ) entwässert. Schließlich wurde das Material für zehn Minuten in Xylol eingestellt und mit Eukitt eingedeckt.

### 3.4. Immunhistochemische Färbungen

#### 3.4.1. Färben von CD 31 Protein, CD 8 Protein und ED1 Protein mit Histostain® Kit.

Für die CD 31, CD 8 und ED 1 Färbungen wurden Kryoschnitte verwendet. Das CD 31 Protein kommt spezifisch auf Endothelzellen vor und kann somit für eine Endothelzellfärbung verwendet werden. Das CD 8 Protein ist spezifisch für zytotoxische T-Zellen und ED 1 für Makrophagen, weswegen diese Färbungen für den Nachweis dieser Zellen verwendet werden.

Die Kryoschnitte wurden nach Entnahme aus dem -20°C Fach für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde das Material 10 Min. lang in 4°C Aceton fixiert. Nach der Fixation wurden die unspezifischen Bindungsstellen zweimal durch Spülen mit PBS geblockt. Anschließend trockneten die Schnitte für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Darauf folgt die Hemmung der endogenen Peroxidase durch Einstellen der Schnitte für 45 Sekunden in einem Gemisch aus kurz vorher angesetztem Methanol und Wasserstoffperoxid (135 ml MetOH+ 15 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Nach gründlichem Waschen in PBS wurden die Objektträger mit Pferdeserum beträufelt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Nachdem das Serum abgekippt, aber nicht abgewaschen war, wurden 50 µl Lösung mit Primärantikörper auf einen einzelnen Gewebeschnitt gegeben und eine Stunde in der feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Der Antikörper wurde im Falle des CD 31 1:30, im Falle des ED 1 1:300 und bei CD 8 1:100 in PBS verdünnt.

Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen und der Sekundärantikörper aufgetragen. Nach zehnminütiger Einwirkzeit wurden das Material erneut gewaschen und die Schnitte mit Enzymkonjugat benetzt. Nach weiteren zehn Minuten wurden dieses wieder abgewaschen und frisch angesetzte DAB Reagenz aufgetragen. Während der Inkubationszeit von drei bis zehn Minuten sollte man den Färbevorgang kontrollieren und bei ausreichender Färbung den Vorgang mit Aqua dest. abstoppen. Die Schnitte konnten jetzt mit Hämalaun gegengefärbt und mit einem wasserlöslichen Eindeckmittel konserviert werden.

### 3.5. Quantifizierung der Gefäßdichte, der zytotoxischen T-Zellen, der Makrophagen und der Tumervolumina

Um das Ausmaß der erfolgten Vaskularisation festzustellen, wurden die mit der CD-31 Färbung sichtbar gemachten Gefäße und Endothelzellsprosse von zwei unabhängigen Personen (Kiderlen M, Hildebrandt S) unter dem Lichtmikroskop quantifiziert. Dazu wurden sechs zufällig ausgewählte Gesichtsfelder (100x Vergrößerung), in denen nur vitales Tumorgewebe zu sehen war, ausgezählt.

Die ED 1 Bestimmung der Makrophagen erfolgte an einem Olympus BH 2. Pro Schnitt wurden 5 Raster á 200µm des Tumors (25x Vergrößerung) ausgezählt.

Die Größenbeurteilung des Tumors erfolgte ebenso an einem Olympus BH 2. Dabei wurden die von den Versuchstieren angefertigten HE- Schnitte in einer 25- fachen Vergrößerung betrachtet. Aus den gemessenen maximalen Längs- und Querdurchmessern wurde näherungsweise das Tumorumfang bestimmt.

Die CD 8 Auszählung wurde ebenso von zwei unabhängigen Personen (Dr. Tilgner J, Hildebrandt S) durchgeführt. Die Auszählung der zytotoxischen T-Zellen erfolgte an einem Leica DM RX Mikroskop (20iger Objektiv). Pro Schnitt wurden 5 Felder á 160000 µm<sup>2</sup> ausgezählt.

Schließlich wurden die Ratten nach Explantationsterminen zu Gruppen zusammengefasst. So gehören die Ratten, die am 12. –15. Tag nach Implantation starben zu Termin 1. Die Ratten von Tag 19- 21 nach Implantation zu Termin 2, die Tiere von Tag 28- 30 nach Implantation zu Termin 3. Letztlich wurden die Tiere von Tag 35- 48 nach Implantation zu Termin 4 und die Ratten von Tag 72 nach Implantation zu Termin 5 gezählt. Der Zählunterschied zwischen beiden Begutachtern betrug in sämtlich Fällen weniger als 10%.

### 3.6. Statistische Auswertung

Für die Auswertung der MR-Volumetrie, der zytotoxischen T-Zellen, der Makrophagen sowie der Vaskularisation wurde der Student's t-test verwendet. Ein p-Wert von < 0,05 galt als statistisch signifikant.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Sphäroidimplantation

Alle Tiere haben sowohl die Implantation als auch die MRT- Messungen gut toleriert. Abgesehen von einer thymektomierten Ratte haben alle Tiere solide Hirntumoren entwickelt. Während des 70-tägigen Versuchsablaufs wurden die Ratten täglich auf neurologische Ausfallserscheinungen untersucht, welche aber nicht festgestellt werden konnten.

### 4.2. Die Rolle der Immunkompetenz im Hinblick auf die MRT- Morphologie

Die Tumoren der thymektomierten Ratten zeichnen sich durch ein starkes Größenwachstum aus. Dieses geht mit der Verdrängung benachbarter Strukturen zur Gegenseite einher. In T2-gewichteten Aufnahmen kann man intratumorale Nekrosen und Einblutungen erkennen, die sich als hypo- bzw. hyperdense Resonanzsignale darstellen lassen. Ebenso spricht ein perifokales Ödem sowie eine inhomogene Aufnahme von Kontrastmittel für den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke.

Die immunkompetenten Ratten zeigen eine differente NMR- Morphologie.

Die Volumetrie ergibt kleinere Tumoren, ebenso ist die lokale Raumforderung weniger ausgeprägt. Die Kontrastmittelaufnahme sowie das perifokale Ödem fallen geringer aus.

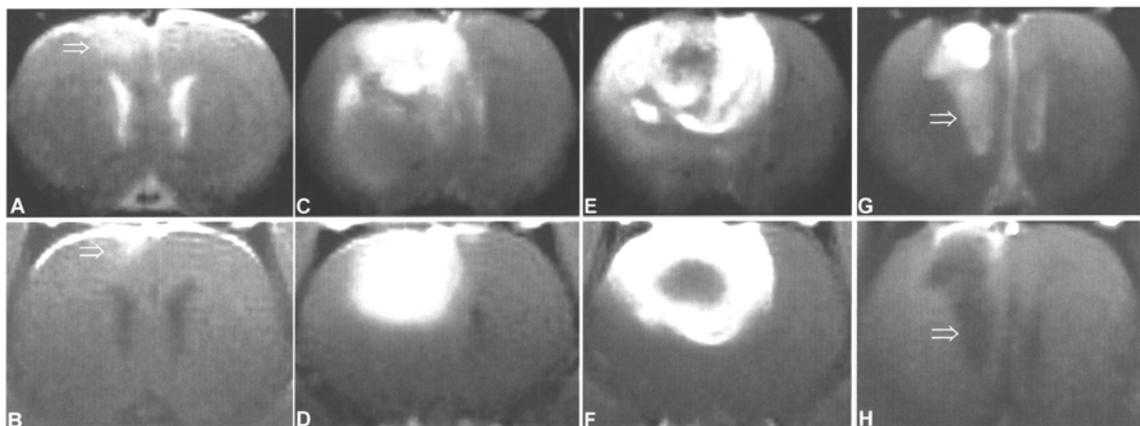


Abb. 3: Obere Zeile T1-w mit KM, Untere Zeile T2-w A,B: 14. Tag post OP, C,D: 21. Tag post OP, E,F: 28. Tag post OP, G,H: 70. Tag post OP

An Tag 14 nach Implantation ist in den MRT- Bildern (A,B) eine kleine Signalanreicherung an der Implantationsstelle zu sehen. An Tag 21 post OP fällt neben einer deutlichen Größenzunahme des Masseneffektes, ein perifokales Ödem sowie eine homogene Kontrastmittelanreicherung auf (C, D). An Tag 28 post OP ist das maximale Tumorwachstum zu verzeichnen. Daneben kommt es zu einem Ansteigen des intrakraniellen Drucks mit Aufbrauchen der cerebralen Liquorräume. Der Tumor fällt durch ein heterogenes Signal in T2 gewichteten MRT-Bildern und einer zentralen Kontrastmittelaussparung, dem Indikator einer Nekrose, auf (E, F). An Tag 70 nach Implantation wurden die Tumoren kleiner und die überlebenden Versuchstiere zeigten einen großen Gehirngewebsdefekt an der Implantationsstelle mit einem erweiterten ipsilateralen Seitenventrikel. Es fiel keine Kontrastmittelanreicherung als Indikator für Tumorrestgewebe auf.

4.3. Der Einfluss der Immunkompetenz auf die Tumorumfänge MR-tomographisch gemessen

Die Tumorumfänge der thymektomierten Ratten unterscheiden sich bei der MRT-Volumetrie deutlich von den immunkompetenten Ratten. Diese zeigen eine Größenreduktion der Tumoren um 31% im Gegensatz zu den thymektomierten Ratten.

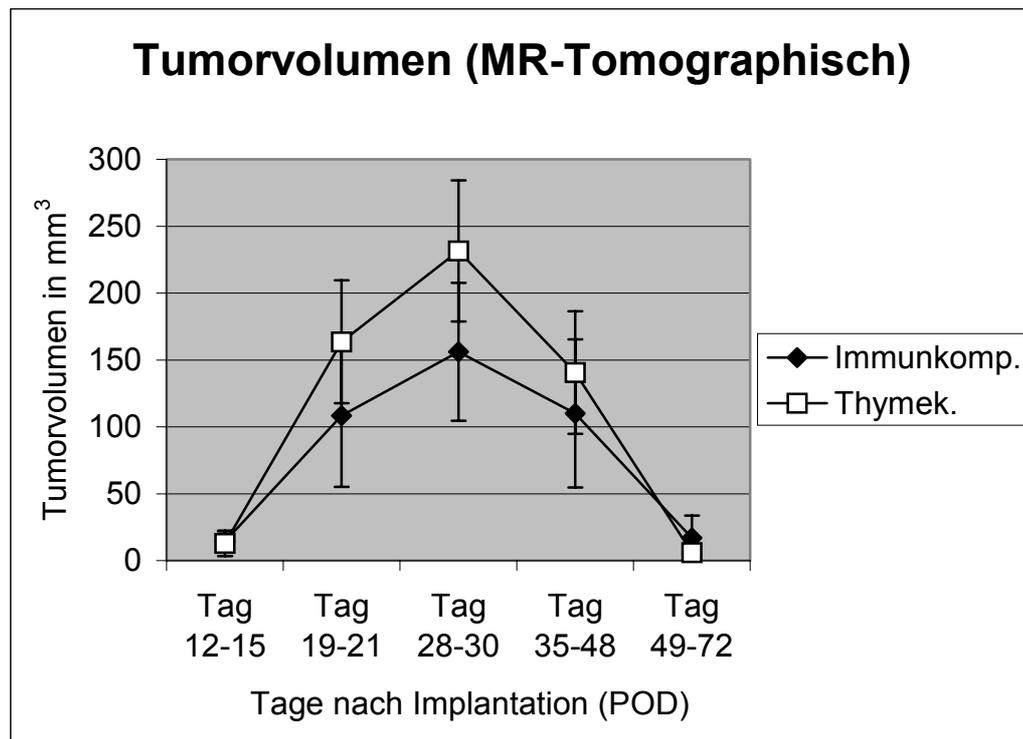


Abb. 4: Tumorumfang der immunkompetenten Ratten im Vergleich zu den thymektomierten Ratten gemessen anhand MRT

4.4. Der Einfluss der Immunkompetenz auf das Tumorumfang gemessen an HE- Schnitten

Die Tumorumfänge bei beiden Rattenpopulationen weisen einen unterschiedlichen Verlauf auf, der von dem Zeitraum nach Implantation beeinflusst wird. Zwischen dem 12. und 15. Tag nach Implantation ist das Tumorumfang der immunkompetenten Ratten mit  $4,3 \text{ mm}^3 (\pm 5,0 \text{ mm}^3)$  nur gering kleiner als das der thymektomierten Ratten ( $5,4 \text{ mm}^3 \pm 3,1 \text{ mm}^3$ ).

Zwischen dem 19. und 21. Tag nach Implantation ist das Tumolvolumen der immunkompetenten Ratten mit  $37,4 \text{ mm}^3$  7 mal größer als das der thymektomierten Ratten ( $5,1 \text{ mm}^3$ ). Diese Entwicklung der Tumorgöße bei den thymektomierten Ratten zeigt sich auch bei den zwischen dem 28. und 30. Tag nach Implantation explantierten Tieren. Die thymektomierten Ratten sind mit  $86,3 \text{ mm}^3$  ca. 4 mal größer als die immunkompetenten Ratten mit  $19,7 \text{ mm}^3$ . Ebenso ist die Tumorumfangdifferenz an Termin 4 (d.h. zwischen dem 35. und 48. Tag nach Implantation) zwischen beiden Rattenpopulationen deutlich zu sehen. Die thymektomierten Ratten weisen ein Tumolvolumen von  $78,2 \text{ mm}^3$  auf, die immunkompetenten Ratten  $7,4 \text{ mm}^3$ . Das bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt die Läsionen der thymektomierten Ratten ca. 10 mal größer sind als die immunkompetenter Ratten. Im weiteren Verlauf gleicht sich das Tumolvolumen beider Populationen wieder an: Am letzten Termin (entspricht dem Zeitraum größer 72. Tag) sind die intracraniellen Raumforderungen der thymektomierten Tiere mit  $0,71 \text{ mm}^3$  zu  $0,54 \text{ mm}^3$  nur unwesentlich größer als die der immunkompetenten.

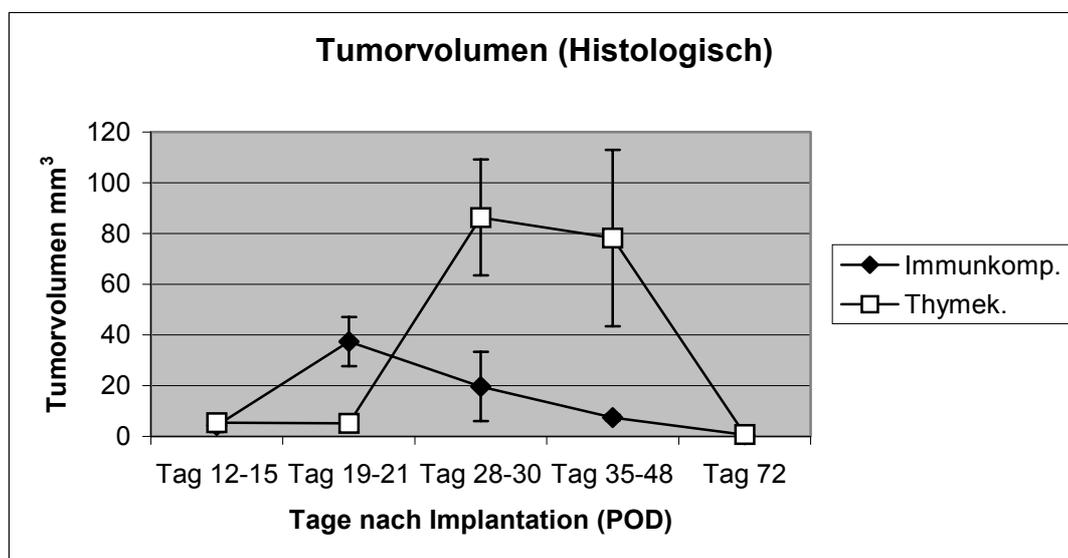


Abb. 5: Tumorumfänge der immunkompetenten Ratten im Vergleich mit den thymektomierten Ratten gemessen anhand HE-Färbungen

#### 4.5. Ergebnisse der Immunhistochemie bei beiden Rattenpopulationen

##### 4.5.1. Zytotoxische T- Zellen (CD 8 -Färbung)

Die zytotoxischen T- Zellen erkennen mit ihrem CD 8-assoziierten T- Zell- Rezeptor das zugehörige Antigen auf z. B. Tumorzellen und führen zur Apoptose dieser Zellen. Immunkompetente Ratten zeigen ein deutlich höheres Vorkommen an zytotoxischen T- Zellen im Vergleich zu den thymektomierten Tieren.

Bereits zwischen den Tagen 12 und 15 nach Implantation weisen die immunkompetenten Ratten eine deutlich höhere Anzahl an zytotoxischen T- Zellen (20,5) auf als die immunsupprimierten Ratten (0). Dies zeigt sich ebenso an den Terminen 3 und 4 (d.h. an den Tagen 28-30 und 35-48 nach Implantation). Dabei beträgt die Anzahl der zytotoxischen T-Zellen bei den immunkompetenten Ratten 14 bzw. 68,5 zu 0 und 12,8 zytotoxischen T-Zellen bei den thymektomierten Ratten.

Dies ist ebenso an den Terminen 1, 2 und 5 der Fall. Die immunkompetenten Ratten zeigen eine höhere die Anzahl an zytotoxischen T-Zellen, wenn auch mit niedrigerem Maximum.

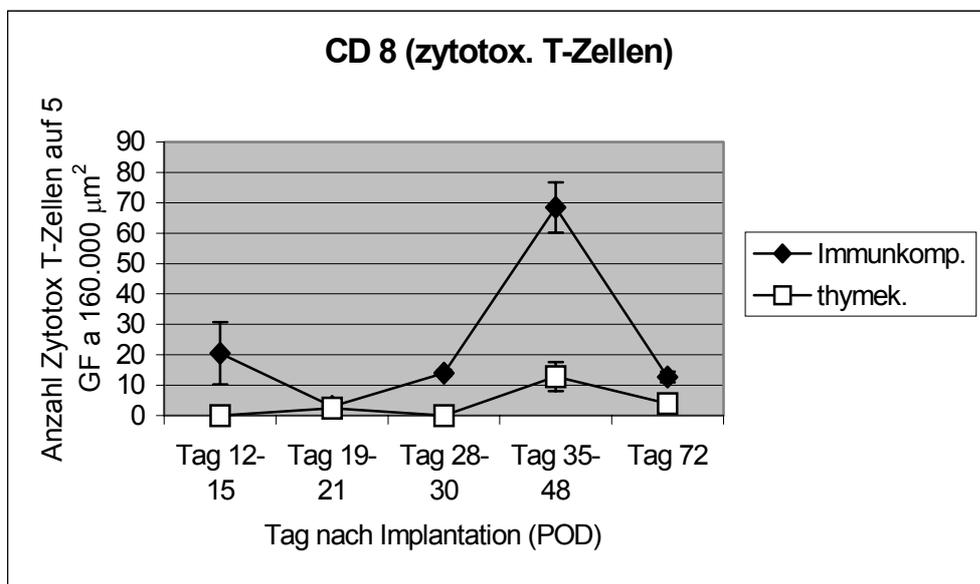


Abb.6 : Vergleich zwischen immunkompetenten und immunsupprimierten Ratten in Bezug auf zytotoxische T- Zellen

#### 4.5.2. Makrophagen (ED 1- Färbung)

Anhand der ED 1- Färbung lassen sich Makrophagen darstellen. Sie befinden sich zumeist im nekrotischen Anteil des Tumors. Der Antikörper bindet spezifisch an lysosomales Oberflächenantigen auf den meisten Makrophagen der Ratten.

Unter Betrachtung der Graphik kann man erkennen, dass an Termin 1 die Makrophagenanzahl der thymektomierten die der immunkompetenten übersteigt. An Termin 2 und 3 kann man dagegen sehen, dass die immunkompetenten Tiere mehr Makrophagen aufweisen als die immunsupprimierten Tiere. An Termin 4 nähern sich beide Gruppen wieder an, aber die immunkompetenten Tiere haben noch immer eine größere Menge an Makrophagen. Schließlich verdeutlicht Termin 5 dieses Ergebnis noch einmal.

Insgesamt ist festzustellen, dass der Vergleich zwischen der Anzahl der Makrophagen der thymektomierten und immunsupprimierten Ratten nicht signifikant ist.

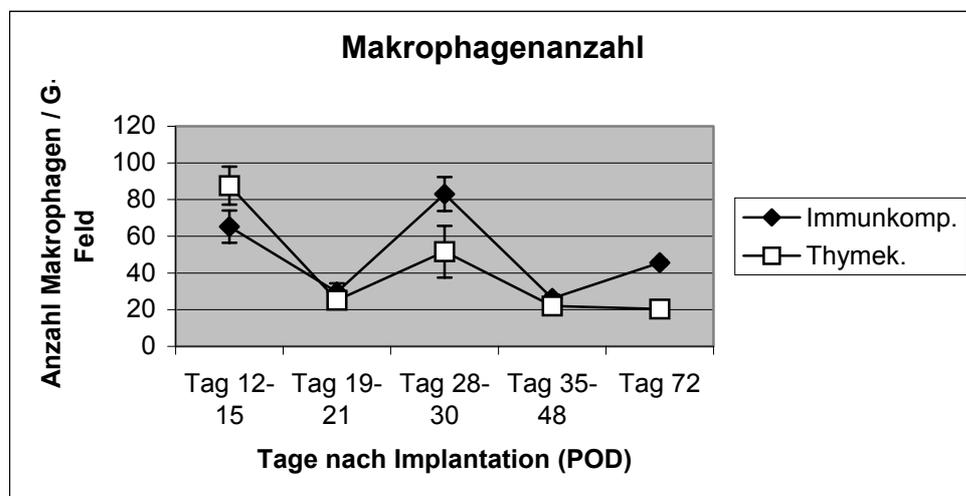


Abb.7 : Anzahl der Makrophagen im Vergleich zwischen thymektomierten und immunkompetenten Ratten

#### 4.5.3 Gefäße (CD 31- Färbung)

Im Hinblick auf die Gefäßbeurteilung fällt einem auf, dass an den Terminen 1 und 2 die Gefäßanzahl pro Gesichtsfeld der immunsupprimierten (7,2 und 8,1 Gefäße) die der kompetenten Tiere (6,9 und 7,2) geringfügig übersteigt. An Terminen 4 und 5 dagegen fällt die Anzahl der Gefäße bei den immunsupprimierten (6,85 und 7,1) unter die der kompetenten Ratten (7,2 und 7,5) zurück.

Bereits bei der morphologischen Betrachtung der CD 31- Färbung viel kein signifikanter Unterschied zwischen thymektomierten und immunkompetenten Ratten auf, die Vaskularisierung schien bei beiden Rattenpopulationen gleich ausgeprägt.

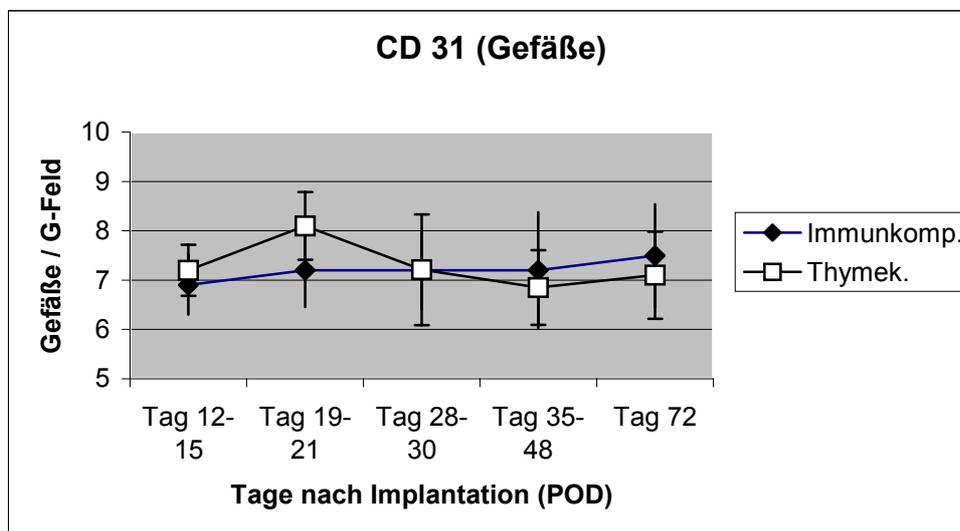


Abb. 8: Anzahl der Gefäßanschnitte bei immunkompetenten und immunsupprimierten Ratten

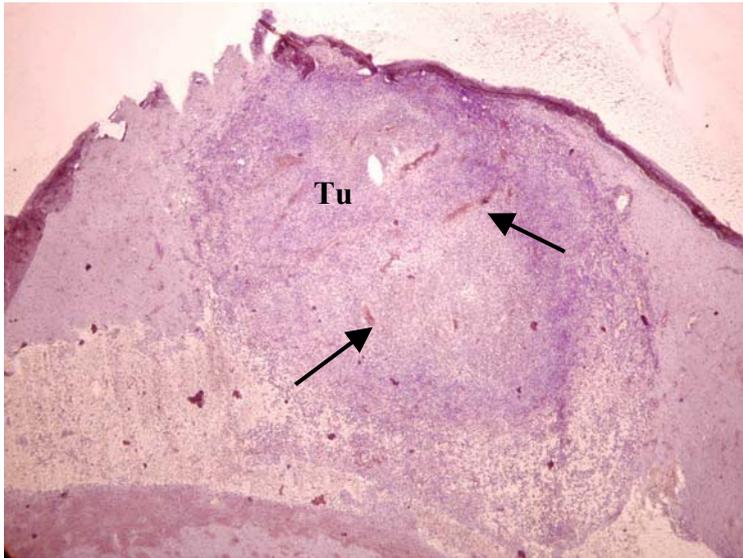


Abb. 9: Übersicht über den Tumor (Tu); zusätzlich sind zahlreiche Gefäßanschnitte (CD 31) sichtbar (Pfeile), 40x

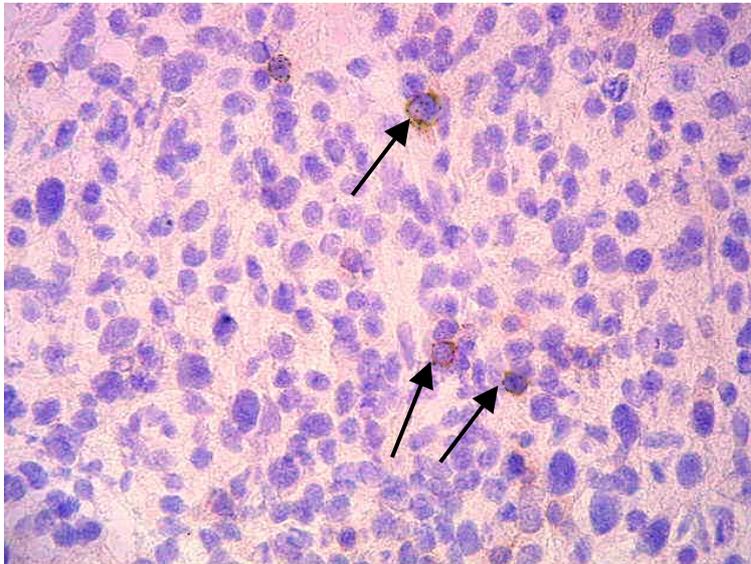


Abb. 10: CD8+ T-Zellen im Tumorgewebe (Pfeile), 400x

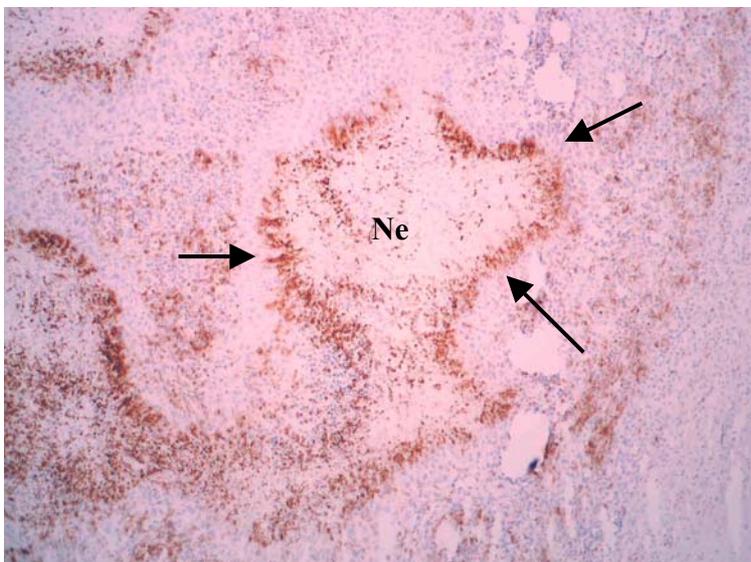


Abb. 11: ED1-Färbung: Gehäuftes Auftreten von Makrophagen (Pfeile) in der Umgebung von Nekrosen (Ne), 200x

## 5. Diskussion

### 5.1. Tumor- Modelle *in vivo*

#### 5.1.1. Sphäroidimplantation als *in vivo* Modell

Diese Arbeit basiert auf einem Ratten-Hirntumormodell, anhand dessen die zeitliche Abfolge einer experimentellen Tumorerkrankung von der Implantation bis zur spontanen Remission bzw. neurologischer Ausfälle und Tod der Tiere untersucht wird. In den letzten 3 Jahrzehnten gab es zahlreiche neue Tumor - Tiermodelle, die dazu führten, dass Ratten-Hirntumormodelle gut charakterisiert und leicht anwendbar wurden [Barth, 1997].

Die Tumoren unserer C6- Sphäroid- Studie erreichten zwischen dem 7. und 32. Tag post implantationem ihr Wachstumsmaximum, ab dem 32. Tag nach Implantation nahmen sie wieder an Größe ab und es kam zu einer spontanen Regression der Tumoren. Ab dem 21. Tag nach Implantation kam es zum Einwachsen der Tumorzellen in den umgebenden Cortex und weiter entlang der neuralen Faserstränge in Richtung Corpus callosum und Capsula interna. Das Ausbreitungsmuster ähnelt dem humaner Glioblastome. Dennoch ermöglicht kein Modell die identische Wiedergabe des humanen Tumorwachstums. Die folgenden Vorgaben sollen allerdings dazu beitragen, dem humanen Tumorwachstum so nahe wie möglich zu kommen [GOLDBRUNNER, 2000b]:

1. Gliale Zellen als Ursprungszellen des Tumors
2. Orthotope Implantation
3. Reproduzierbarkeit der Wachstumsrate
4. Gliomartige Wachstumscharakteristika im Gehirn
5. Ausreichende Dauer des Tumorwachstums, um Therapiestudien zu erlauben
6. Berücksichtigung der immunologischen Situation
7. Möglichkeit des *in vivo*- Wachstummonitorings

Bei der Forschung an Gehirntumoren sollten orthotope Tiermodelle zur Anwendung kommen. Gliome weisen ein organspezifisches Wachstums- und Invasionsverhalten auf

und nur innerhalb des Gehirns wird ein gliomtypisches Tumorwachstum erreicht. Dies ist durch die Abhängigkeit der Gliomzellen von komplexen Interaktionen zwischen Gliomzellen und gehirnspezifischer extrazellulärer Matrix bedingt. Die Forderung nach orthotoper Implantation wird wegen des intrakraniellen Implantationsaufwandes nur von wenigen Modellen erfüllt.

Sphäroide sind dreidimensionale Tumoren von definierter Größe und Zellzahl, die aus Zelllinien und aus Gewebeproben hergestellt werden. Sphäroide aus Gliomzellen weisen charakterisierte, organspezifische Expressionsmuster für Komponenten der Extrazellulärmatrix, Rezeptoren und Wachstumsfaktoren auf und ähneln dadurch soliden Tumoren. Ebenso ähnelt die Wachstumsgeschwindigkeit der normaler Neoplasien.

Die Implantation eines solchen Sphäroids in das passende Zielgewebe ermöglicht die Bildung eines kleinen asymptomatischen Primärtumors. Diese Methode wird z.B. bei der Implantation von Sphäroiden genutzt, die aus C6-Rattengliomzellen gewonnen werden [FARRELL, 1988, GOLDBRUNNER, 1999, PARSA, 2000]. Aus den implantierten neoplastischen Zellen entsteht ein schnell wachsender Tumor mit vielen Eigenschaften des Glioblastoma multiforme.

Die Vorteile dieses Systems bestehen einerseits in der

1. dreidimensionalen Struktur des Primärtumors,
2. der leichten Reproduzierbarkeit
3. der definierten Tumormasse [FARREL, 1987].

Die genaue Positionierung des Sphäroids im Wirtsgewebe stellt einen großen Vorteil gegenüber der stereotaktischen Implantation von Zellsuspensionen dar. Hierbei ist nicht immer ersichtlich, wie weit sich die Zellen von der primären Läsionsstelle entfernen und anwachsen.

Die Nachteile des Sphäroidsystems liegen dagegen

1. im Implantationsaufwand
2. im Setzen einer großen Wunde und damit einhergehender Entzündungsreaktion
3. im Nichterkennen des Vitalitätszustandes der implantierten Zellen. Sphäroide werden nach Größe implantiert, der Vitalitätszustand im Inneren ist nur schwer beurteilbar.

Kultiviert man Zellen als Monolayer, so entspricht das nur begrenzt den Eigenschaften eines dreidimensionalen Tumors. Die Zellen eines dreidimensionalen Tumors sind einem unterschiedlichen Angebot an Sauerstoff und Nahrungsstoffen sowie physischen und chemischen Stress in unterschiedlicher Stärke ausgesetzt [SANTINI, 1999]. Dies hat großen Einfluss auf die Morphologie der Gewebsneubildung, da in Bereichen schlechter Sauerstoffversorgung Zellschäden und Nekrosen auftreten können [FOLKMAN, 1971].

Die Monolayer- Zellen finden dagegen weitgehend die gleichen Bedingungen vor, was die *in situ*- Situation solider Tumoren nicht exakt widerspiegelt.

Monolayer-Zellen wachsen deswegen auch exponentiell, während solide Tumorzellen und Spheroide durch eine Phase exponentiellen Wachstums gefolgt von verlangsamtem Wachstum charakterisiert sind (bedingt durch die abnehmende Ernährungssituation) [SUTHERLAND, 1988].

#### 5.1.2. C6- Sphäroidimplantation

Das C6- Gliom- Sphäroid- Modell wurde intensiv genutzt, Wachstumskriterien, Mechanismen der Neoangiogenese, ebenso wie die Expression von Wachstumsfaktoren und –Rezeptoren anhand des Wachstums eines astrozytischen Tumors zu beobachten [FARRELL, 1987].

Unsere Ergebnisse sind in der Reihe anderer Ergebnisse zu betrachten, die bestätigen, dass das Modell gut die biologischen Zellstadien frühen Gliomwachstums im Menschen nachahmt.

Die präsentierten Daten zeigen zusätzlich, dass die implantierten C6-Gliomzellen über einen Zeitraum von 4 Wochen wachsen, um dann spontan zu verschwinden und zu einer kompletten Regression führen.

Obgleich derartige Vorgänge schon beobachtet wurden, bleiben die genauen Mechanismen weiterhin unklar [MOKRY, 1992]. Diese Ergebnisse sollten aber mit in die Überlegungen einbezogen werden, wenn die Entscheidung zu einem bestimmten Studien- und Tiermodell aussteht.

Das C6-Tiermodell ist ein adäquates Modell um die verschiedenen Abläufe des Phänomens der spontanen Tumorregression zu beobachten.

## 5.2. Spontane Tumorregression beim Menschen – und im Tiermodell.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, treten vor allem bei höchst immunogenen Tumoren selten Fälle spontaner Regression auf [PAPAC, 1998]. Darunter versteht man das teilweise oder vollständige Verschwinden eines Neoplasmas ohne Behandlung. Des weiteren bedeutet spontane Regression nicht, dass die systemische Krankheit geheilt oder die Regression von Dauer ist [BODEY, 2002]

Spontane Regressionen traten bei den verschiedensten intracraniellen Raumforderungen auf, so z.B. bei Gliomen des Nervus Optikus [PARSA, 2001] und der Pons [LENARD, 1998], verschiedenen Astrozytomen [KERNAN, 1998] und primären cerebralen Lymphomen [AL-YAMANY, 1999].

Diese klinischen Berichte erinnern an die präsentierten Ergebnisse der orthotopen C6-Gliomsphäroid- Implantation. Hier kam es zum größten Wachstumsdurchmesser am 32. Tag *post implantationem*. Anschließend kam es gleichermaßen bei den

immunkompetenten als auch thymektomierten Ratten zu einer Größenabnahme, zu einer kompletten Tumorregression.

### 5.3. Immunologie der Tumoren

Das Gehirn ist immunologisch privilegiert [MEDAWAR, 1948].

Die Blut- Hirn- Schranke wirkt regulierend auf den Eintritt von Entzündungszellen und immunregulierenden Molekülen [ROTH, 1999]. Die Blut- Hirn- Schranke (BHS) wird durch Kapillarendothelien gebildet, welche durch tight junctions verknüpft sind. Diese erlauben nur Partikel kleiner 2 Nanometer den Durchtritt durch die BHS. Tumorerkrankungen führen zu einem Aufbrechen des Endothelzellverbandes und zu einem Verlust der Schutzwirkung der Blut- Hirn- Schranke. Dadurch kommt es zu einem Ausbreiten der Tumorzellen. Diese können bis zu 5 cm vom makroskopisch sichtbaren Tumor entfernt gefunden werden. Diesem invasiven Wachstumsverhalten entgegen zu wirken, mag eine Hauptrolle der extrazellulären Zielenzyme sein.

So führen membran- assoziierte Zytokine, wie z.B. CD 95 (APO-1/FAS- Ligand) und durch TNF- vermittelte Apoptose zum Zelltod der Tumorzelle mittels T- Zellen und NK- Zellen. Dies geschieht durch direkte Lyse. Die C6- Zellen sind nicht die Zielzellen zytotoxischer Lymphozyten (durch MHC- Klasse I vermittelt). Sie werden vielmehr von natürlichen Killerzellen angegangen, die ein nicht MHC- vermitteltes Erkennen voraussetzen. Die durch natürliche Killerzellen vermittelte Tumorerstörung beinhaltet einen komplexen Vorgang des Erkennens, Aktivierens und der Vermittlung von NK- Zellen. Die Natürlichen Killerzellen durchlöchern die Opfer- Zellmembran durch Perforine, induzieren Nekrose und Apoptose, was schließlich zur Zytolyse der Opferzelle führt.

In Wistar- Ratten wurde gezeigt, dass eine verminderte Ausprägung von NK- Zellen (durch anti- sialo GM 1 Antikörper) die Abstoßung von implantierten AK- 5 Tumoren verhinderten.

Die zellbiologischen Mechanismen, die die Tumorabstoßung bedingen, werden nur teilweise verstanden. Die experimentellen Daten lassen vermuten, dass kein Einzelmechanismus dieses Phänomen erklären kann. Die Zerstörung von Tumorzellen durch Perforin- vermittelte Nekrose und Tumorzell- Apoptose scheint eher das Ergebnis einer Reihe von tumor- und wirtabhängigen Mechanismen darzustellen.

Die humorale und zellvermittelte Immunantwort des Wirtsorganismus auf die implantierten Tumoren stützt sich auf die Aktivierung von Phagozyten- abhängigen T- Helfer und zytotoxischen Typ 1-Reaktionen. Diese Reaktion wird zusätzlich durch die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL 2 und TNF- $\alpha$  gestärkt. TNF- $\alpha$  stimuliert das Wachstum von T- Zellen und erhöht die Zytotoxizität von Monozyten, Granulozyten und Natürlichen Killerzellen.

Gehirntumoren lösen keine starke Immunantwort aus. Ein Grund mag in der verminderten Expression von MHC- I und II- Komplexen in C6-Zellen liegen [PROESCHOLDT, 2001]. Tatsächlich exprimieren viele Gehirntumoren wenige MHC I- und II- Allele. Zu diesem Ergebnis kam die Forschergruppe um Proescholdt, die den Unterschied zwischen intrakraniellen und subkutanen Glioblastomimplantationen untersuchte. Sie stellten eine verminderte Ausprägung der intrakraniellen MHC I-und II- Proteine im Gegensatz zu subkutanen Glioblastomen fest.

Des Weiteren stellte diese Forschergruppe zu Beginn des Tumorwachstums eine verminderte Anzahl an CD 4/ CD 8 Lymphozyten intrakraniell fest. Mit der Studiendauer und zunehmendem Wachstum nahm aber die Anzahl an CD 4/ CD 8 Lymphozyten intrakraniell zu.

Dies ist auch ein Ergebnis, das wir in unserer Studie feststellen konnten. Zwischen dem 21. und 32. Tag nach Implantation nahm die Zahl der CD 8 zytotoxischen Leukozyten zu, um gegen Ende des Versuchs wieder abzunehmen.

Diese Tatsache könnte Grund für das Verschwinden von Tumoren sowohl in der Gruppe der immunkompetenten als auch thymektomierten Tieren unserer Serie sein.

Wie viele Tumorzellen nun der CD 4- und CD 8- T- Zellen vermittelten Tumorummunreaktion zum Opfer fallen, ist nicht ermittelt.

Trotz intensivster Forschungen, auch anhand verschiedener Tiermodelle, konnte noch keine entscheidende Verbesserung der Überlebenszeit der Patienten erreicht werden. Diese liegt auch bei Einsatz aller therapeutischer Optionen im Mittel unter 1 Jahr [PARNEY, 2000, SCHLEGEL, 1998]. Dennoch bleibt festzustellen, dass anhand der Tiermodelle viele Stadien der Tumorerkrankung besser verstanden werden. Ebenso konnten dadurch Studien zur Wachstumskinetik, der Neoangiogenese und der Expression von Wachstumsfaktoren stattfinden.

Anhand dieser Studie konnte eine Parallele zur sehr seltenen spontanen Tumorregression von Gehirntumoren im Menschen gezogen werden.

Dennoch bleibt es unklar, weswegen der C6- Tumor zuerst wächst, um einen riesigen Masseneffekt zu bewirken und dann wieder verschwindet.

Das C6- Gliommodell ist ein Ansatz, die einzelnen Schritte der spontanen Tumorregression in der Ratte zu studieren und somit auch Zusammenhänge der Tumorentwicklung im Menschen zu verstehen. Nichtsdestoweniger herrscht weiterer Forschungsbedarf im Hinblick auf Tumorgenese im Menschen, um wirkungsvolle Therapie zu finden und die Überlebenszeit der Patienten zu verlängern.

## 6. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Beschreibung einer in früheren Versuchsserien zufällig gemachten Beobachtung, dass es zu einer Spontanregression experimenteller Gliome kommt. Dies geschah mittels eines Vergleichs des Spontanverlaufs intracerebraler Gliome bei immunkompetenten und thymektomierten Ratten anhand immunologischer und MRT- Studien.

Verwendet wurden C6-Rattengliomzellen. Daraus wurden ca. 300 µm große Tumorsphäroide hergestellt, die beiden Rattenstämmen (16 immunkompetenten und 16 immunsupprimierten Sprague- Dawley-Ratten) in den Kortex des linken Frontallappens implantiert wurden. Mittels der MR-Tomographie wurden die Tiere an definierten Terminen auf das Tumorwachstum hin untersucht. Anschließend wurde jeweils eine bestimmte Anzahl an Tumorproben entnommen und mittels der Hämatoxylin- Eosin- bzw. immunhistochemischen Färbungen aufgearbeitet.

Mittels der Kernspintomographie konnte gezeigt werden, dass die thymektomierten Ratten um 31 % größere Tumoren aufweisen als die immunkompetenten Ratten. Dies wird ebenso bei der histologischen Auswertung der Tumorumfänge (anhand von HE-Schnitten) verdeutlicht.

Ebenso konnte aber auch gezeigt werden, dass die Tumorumfänge nach Erreichen des Volumenmaximums (zwischen dem 28.- 30. Tag nach Implantation) in beiden Populationen stark rückläufig sind, um nach dem 72. Tag nach Implantation fast vollständig zu verschwinden.

Im Hinblick auf mögliche immunologische Einflussfaktoren, die bislang noch nicht geklärt werden konnten, sind folgende Ergebnisse zu nennen: Zytotoxische T- Zellen sind in immunkompetenten Ratten in etwas höherer Anzahl nachzuweisen als in thymektomierten Ratten.

Mittels der ED- 1- Färbung können Makrophagen nachgewiesen werden, welche bei den immunkompetenten Ratten kaum in höherer Anzahl zu sehen sind. Im Hinblick auf die Gefäßbeurteilung der Tumoren beider Rattenpopulationen kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Diese Arbeit zieht eine Parallele zwischen der bisher seltenen klinischen spontanen Tumorregression von Gehirntumoren im Menschen und einer C6- Sphäroidimplantation in Ratten.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

A.d.	Aqua dest.
Ag	Antigen
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CCT	Cranielle Computertomographie
CISS	constructive interference in steady state
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(zelluläre) Desoxyribonucleinsäure
ECM	Extrazelluärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FCS	fetal calf serum
GBM	Glioblastoma multiforme
HCL	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IFN	Interferon
Ig	Immunglobuline
i.m.	intramuskulär
IL	Interleukine

kDa	Kilodalton
LAK-Zellen	Lymphozytenaktivierte Killerzellen
MetOH	Methanol
µm	Mikrometer ( $10^{-6m}$ )
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS	phosphat buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
POD	Tag(e) nach Implantation
rpm	rounds per minute
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VDEPT	virus directed enzymatic prodrug therapy
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8. Literaturverzeichnis

Al-Yamany M, Lozano A, Nag S, Laperriere N, Bernstein N. Spontaneous remission of primary central nervous system lymphoma: report of 3 cases and discussion of pathophysiology. *J Neurooncol* 42: 151-159, 1999

Barker M, Hoshino T, Gurcay O, Wilson CB, Nielsen SL, Downie R, Eliason J. Development of an animal brain tumor model and its response therapy with 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosurea. *Cancer Res* 33: 976-986, 1973

Barth RF. Rat brain models in experimental neuro- oncology: the 9 L, C6, F98, RG 2, (D 74), RT-2 and CNS- 1 Gliomas. *Journal of Neuro- oncology* 36: 91-102, 1998

Bederson JB, Bartkowski HM, Moon K, Halks-Miller M, Nishimura MC, Brant-Zawadski M, Pitts LH. Nuclear magnetic resonance imaging and spectroscopy in experimental brain edema in a rat model. *J Neurosurg* 64(5):795-802, 1986

Benda P, Someda K, Messer J, Sweet VH. Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg* 34: 310-323, 1971

Bendszus M, Burger R, Vince GH, Solymosi L. A reproducible model of an epidural mass lesion in rodents. Part II: Characterization by in vivo magnetic resonance imaging. *J Neurosurg* 97(6):1419-23, 2002

Berlit P (Hrsg.).

*Klinische Neurologie*, Springer, 641-645, 1999

Blume MR, Wilson CB, Vasquez DA. Immune response to a transplantable intracerebral glioma in rats. *Recent progress in Neurologic Surgery. Ercerpta Medica* 129-134, 1974

Bodey B. Spontaneous regression of neoplasms: new possibilities for immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 2: 459-476, 2002

Brown P, Buckner J.: Temozolomide: too early for definitive conclusions. *J Clin Oncol* 21(19): 3710, 2003

Citow JS, Wollmann RL, Macdonald RL. *Neuropathology and Neuroradiology: A Review*. Thieme, 46-107, 2001

Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. In vivo gene transfer with retroviral vector producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-1552, 1992

D' Atri S, Tentori L, Lacal PM, Graziani G, Pagani E, Benincasa E, Zambruno G, Bonmassar E, Jiricny J. Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. *Mol Pharmacol* 54: 334-341, 1998

Davis FG, Kupelian V, Freels S, McCarthy B, Surawicz T. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by behavior and major histology groups. *Neurooncol* 3:152-158, 2001

Dennie J, Mandeville JB, Boxerman JL, Packard SD, Rosen BR, Weisskoff RM. NMR imaging of changes in vascular morphology due to tumor angiogenesis. *Magn Reson Med* 40: 793, 1998

Druckrey H, Ivankovic S, Preussmann R. Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N- Methyl - N- Nitrosoharnstoff. *Z Krebsforsch* 25: 389-408, 1964

Farrel CL, Stewart PA, Del Maestro RF. A new glioma model in rat: The C6 spheroid implantation technique permeability and vascular characterisation. *J Neuro-Oncol.* 4: 403-415, 1987

Farrell C, Megyesi J, Del Maestro R. Effect of ibuprofen on tumor growth in the C6 spheroid implantation glioma model. *J Neurosurgery* 68: 925- 930, 1988

Fine HA Novel biologic therapies for malignant gliomas. Antiangiogenesis, immunotherapy and gene therapy. *Neurol Clin* 13 (4): 827-46, 1995

Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186, 1971

Goetz CG, Pappert EJ. *Textbook of Clinical Neurology*, W.B., Saunders Company, 933-955, 2003

Goldbrunner RH, Bernstein J, Plate K, Vince GH, Roosen K, Tonn JC. Vascularization of human glioma spheroids implanted into rat cortex is conferred by two distinct mechanisms. *J of Neuroscience research* 55: 486- 495, 1999

Goldbrunner RH, Bendszus M, Sasaki M, Kraemer T, Plate K, Roosen K, Tonn JC. Vascular endothelial growth factor- driven glioma growth and vascularization in an orthotopic rat model monitored by magnetic resonance imaging. *J Neurosurgery* 47: 921- 929, 2000 a

Goldbrunner RH, Wagner S, Roosen K, Tonn JC. Models for assessment of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol* 50(1-2):53-62, 2000 b

Gottschalk S, Tavakolian R, Buske A, Tinschert S, Lehmann R. Spontaneous remission of chiasmatic/hypothalamic masses in neurofibromatosis type 1: report of two cases. *Neuroradiology* 41(3):199-.201, 1999

Greenberg H, Chandler W, Sandler H. Brain Tumors, Contemporary neurology series (CNS), 116-157, 1999

Gradishar WJ. An overview of clinical trials involving inhibitors of angiogenesis and their mechanism of action. Invest New Drugs 15: 49-59, 1997

Hirose Y, Hayashi T, Sagoh M, Murakami H. Secondary glioblastoma remarkably reduced by steroid administration after anaplastic transformation from gliomatosis cerebri-case report. Neurol Med Chir (Tokyo). 38(12):865-70, 1998

Jaekle KA, Kenneth RH, Yung WKA, Greenberg H, Fine H, Schiff D, Pollak IF, Kuhn J, Fink K, Mehta M, Cloughesy T, Nicholas MK, Chang S, Prados M.: Phase II Evaluation of Temozolomide and 13-cis-Retinoic Acid for the Treatment of Recurrent and Progressive Malignant Glioma: A North American Brain Tumor Consortium Study: J Clin Oncol 21: 2305-2311, 2003

Kernan JC, Horgan MA, Piatt JH, D'Agostino A: Spontaneous involution of a diencephalic astrocytoma, Pediatr Neurosurg 29: 149-153, 1998

Kessel RG. Basic Medical Histology, The biology of cells, tissues, and organs. Oxford University Press 266-268, 1998

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. Brain Pathol 3: 255-268, 1993

Kleihues P, Kiessling M, Wiestler OD. Tumoren des Nervensystems. Lehrbuch der Pathologie, Urban und Schwarzenberg: 299-314, 1996

Kreth FW, Warnke PC, Scheremet R, Ostertag CB. Surgical resection and radiation therapy versus biopsy and radiation therapy in the treatment of glioblastoma multiforme. J Neurosurg 78(5):762-6, 1993

Kurpad SN, Zhao XG, Wikstrand CJ, Batra SK, McLendon RE, Bigner DD. Tumor antigens in astrocytic gliomas. *Glia* 15: 244-256, 1995

Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95: 190-198, 2001

Lampson LA. Immunobiology of brain tumors: Antigens, effectors, and delivery to sites of microscopic tumor in the brain, Black PM, Loeffler JS (eds): *Cancer of the Nervous system*. Cambridge, Blackwell Science, 874-906, 1997

Laws ER, Parney IF, Huang W, Anderson F, Morris AM, Asher A, Lillehei KO, Bernstein M, Brem H, Sloan A, Berger MS, Chang S. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the glioma outcomes project. *J Neurosurg* 99: 467-473, 2003

Lenard HG, Engelbrecht V, Janssen G, Wechsler W, Tautz C: Complete remission of a diffuse pontine glioma. *Neuropediatrics* 29: 328-330, 1998

Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin. III. the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 29, 1948

Merchant RE, Ellison ED, Young HF. Immunotherapy for malignant glioma using human recombinant interleukin-2 and activated autologous lymphocytes. *J Neurooncol* 8: 173-188, 1990

Mokry J, Nemecek S, Adler J. Inoculation of C6 glioma cell suspension into the brain of adult rats: morphological study. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove*. 35 (4):293- 305, 1992

Nagano N, Sasaki H, Aoyagi M, Hirakawa K. Invasion of experimental rat brain tumor: Early morphometrical changes following microinjection of C6 glioma cells. *Acta Neuropathol* 86: 117-125, 1993

Nelson NJ. Inhibitors of angiogenesis phase III testing. *J Natl Cancer Inst* 90: 960-963, 1998

Oldfeld EH. Recombinant immunotoxin perfusion of malignant brain tumors: The results of a clinical trial. *J Neurooncol* 28:49,1996

Papac RJ. Spontaneous regression of cancer: possible mechanisms. *In Vivo* 12: 571-578, 1998

Parney IF, Hao CH, Petruk KC. Glioma immunology and immunotherapy. *J Neurosurgery*, 46,4: 778-792, 2000

Parney IF, Chang LJ. Cancer Immunogene Therapy A Review. *J Biomed Sci* 10: 37-43, 2003

Parsa A, Chakrabarti I, Hurley P, Chi J, Hall J, Kaiser M, Bruce J. Limitations of the C6 / Wistar rat intracerebral glioma model: implications for evaluating immunotherapy. *J Neurosurgery* 47, 4, 993- 999, 2000

Parsa CF, Hoyt CS, Lesser RL, Weinstein JM, Strother CM, Muci-Mendoza R, Ramella M, Manor RD, Fletcher WA, Repka MX, Garrity JA, Ebner RN, Monteiro ML, McFadzean RM, Rubtsova IV, Hoyt WF. Spontaneous regression of optic gliomas: thirteen cases documented by serial neuroimaging. *Arch Ophtalmol* 119: 516-529, 2001

Peterson LD, Sheridan PJ, Brown WE. Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions. *J Neurosurgery* 80: 865-876, 1994

Plate KH. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropath. and Exp Neur.* 4: 313-320, 1999

Poeck K, Hacke W: Hirntumoren  
Lehrbuch der Neurologie, Springer, 297-346, 1998

Proescholdt MA, Merrill MJ, Ikejiri BS, Walbridge S, Akbasak A, Jacobson S, Oldfield EH. Site specific immune response to implanted gliomas. *J Neurosurg* 95:1012-1019, 2001

Raila FA, Bowles APJ, Perkins E, Terrell A. Sequential imaging and volumetric analysis of an intracerebral C6 glioma by means of a clinical MRI system. *J Neuro-Oncol* 43: 11, 1999

Rana MW, Pinkerton H, Thornton H, Nagy D. Heterotransplantation of human glioblastoma multiforme and meningioma to nude mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 155 (1):85-8, 1977

Roth W, Weller M. Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives. *CMLS Cell Mol. Life Sci*, 1999

Saini M, Bellinzona M, Meyer F, Cali G, Samii M. Morphometrical characterization of two glioma models in the brain of immunocompetent and in immunodeficient rats. *Journal of Neurooncol* 42 (1): 59-67, 1999

Santini MT, Rainaldi G. Three- dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 67:148- 157, 1999

Schirmer M, *Neurochirurgie*. Urban und Schwarzenberg, 205-257, 1998

Schlegel U, Westphal M, *Gentherapie bei Hirntumoren*  
*Neuroonkologie*, Thieme, 421-423, 1997

Schweitzer T, Tilgner C, Vince GH, Herbold C, Roosen K, Tonn JC. Extranatural metastasis of primary brain tumors. *J Neurooncol* 53(2):107-14, 2001

Silbernagl S, Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie. Thieme, 94-99, 2000

Staines N, Brostoff J, James K. Immunologisches Grundwissen. Gustav Fischer, 21-82, 1997

Steward WP, Thomas AL. Marimastat: the clinical development of a matrix metalloproteinase inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs*. 9(12): 2913-22, 2000

Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicellular spheroid model. *Science* 240:177-184, 1988

Tonn JC, Westphal M. Immuntherapie bei Hirntumoren. *Neuroonkologie*, Thieme, 423-426, 1997

Vince GH, Herbold C, Klein R, Kuh J, Pietsch T, Franz S, Roosen K, Tonn JC. Medulloblastoma displays distinct regional matrix metalloprotease expression. *J Neurooncol* 53(2):99-106, 2001

Vince GH, Wagner S, Pietsch T, Klein R, Goldbrunner RH, Roosen K, Tonn JC. Heterogeneous regional expression patterns of matrix metalloproteinases in human malignant gliomas. *Int J Dev Neurosci* 17(5-6):437-45, 1999.

Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA, Strike TA. Evaluation of BCNU and/ or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. *J Neurosurg* 49:333-343, 1978

Wong ET, Hess KR, Gleason MJ, Jaeckle KA, Kyritsis AP, Prados MD, Levin VA, Yung WK. Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. *J Clin Oncol* 17: 2572-2578, 1999

Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD, Brada M, Spence A, Hohl RJ, Shapiro W, Glantz M, Greenberg H, Selker RG, Vick NA, Rampling R, Friedman H, Phillips P, Bruner J, Yue N, Osoba D, Zaknoen S, Levin VA. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer* 83: 588-593, 2000

Zinkernagel RM. Grundlagen der Immunologie  
Medizinische Mikrobiologie. Thieme, 47-147, 1997

Zizka J, Elias P, Jakubec J. Spontaneous regression of low-grade astrocytomas: an underrecognized condition? *Eur Radiol* 10(7):1076-8., 2000

Zuccoli G, Ferrozzi F, Sigorini M, Viridis R, Bassi P, Bellomi M. Early spontaneous regression of a hypothalamic/chiasmatic mass in neurofibromatosis type 1: MR findings. *Eur Radiol* 11(12):2638-40, 2001

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Roosen für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im tumorbiologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Vince für die Begleitung des Themas, die Geduld und zahlreichen Anregungen, sprich er hat die Arbeit erst ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. W. Roggendorf danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Dank schulde ich auch Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Bendszus für die durchgeführten kernspintomographischen Versuche.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. T. Schweitzer und Herrn Dr. M. Kiderlen für die allseits gewährte Unterstützung, Anleitung und Diskussionsbereitschaft beim Zustandekommen dieser Arbeit.

Danken möchte ich Herrn Dr. J. Tilgner, dessen Mitarbeit und Anregungen ein wertvoller Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit waren.

Frau Brügger danke ich für die Unterstützung der Pflege der Versuchstiere und Frau Kerkau danke ich für die Einweisung in die Zellkultur.

Allen biologischen und medizinischen Mitarbeitern des tumorbiologischen Labors der Neurochirurgie danke ich für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und für die freundschaftliche Unterstützung während der gesamten gesamten Dauer der Doktorarbeit.

## **Lebenslauf**

Sabine Hildebrandt  
Weingartenstraße 33  
97072 Würzburg  
++49-931-8803679

## ***Persönliche Daten***

Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch  
Religion: röm. katholisch  
Alter: 27  
Geburtsort: Weiden i.d.Opf.

## ***Schulausbildung***

09/1982 – 07/1986	Grundschule Hammerweg, Weiden
09/1986 - 07/1995	Elly-Heuss-Gymnasium; Weiden
07/1995	Abitur

## ***Hochschulausbildung***

05/1996 – 08/1998	Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians Universität Würzburg
08/1998	Physikum
11/1998 – 08/2001	Klinisches Studium an der Universität Würzburg
09/1999	Erstes Staatsexamen
09/2001	Zweites Staatsexamen
10/2001 - 09/2002	Praktisches Jahr
11/2002	Drittes Staatsexamen

## ***Ärztliche Tätigkeit***

Seit 02/2003	ÄIP an der Frauenklinik Caritaskrankenhaus, Bad Mergentheim
--------------	---

Würzburg, 22. Januar 2004