

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die neurotoxische Wirkung der Zytostatika Cyclophosphamid
und Thiotepa im infantilen Gehirn der Ratte

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Susanne Pruskil

aus Tübingen

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. H. Ikonomidou
2. Prof. Dr. I. Krägeloh-Mann
3. PD Dr. U. Felderhoff-Müser

Datum der Promotion: 24.02.2006

In memoriam meinem Großvater
Otto Litz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1 Maligne Tumorerkrankungen im Kindesalter | 5 |
| 1.2 Die Periode des rapiden Hirnwachstums (Brain growth spurt period) | 7 |
| 1.3 Pathophysiologie der zentralnervösen Toxizität der Zytostatika | 8 |
| 1.4 Exzitotoxizität | 9 |
| 1.5 Apoptose..... | 11 |
| 1.5.1 Morphologische Kennzeichen der Apoptose | 11 |
| 1.5.2 Die genetische Regulation der Apoptose | 11 |
| 1.6 Die Zytostatika Cyclophosphamid und Thiotepa..... | 13 |
| 1.6.1 Cyclophosphamid..... | 13 |
| 1.6.2 Thiotepa | 14 |
| 1.7 Formulierung der zentralen Fragestellung der Arbeit | 14 |
| 2. Material und Methoden | 15 |
| 2.1 Tierversuche: Tiere, Injektionen, ethische Richtlinien | 15 |
| 2.2 Perfusion, Einbettung, Schnitt..... | 15 |
| 2.3 De Olmos Kupfersilberfärbung | 18 |
| 2.4 Morphometrie | 19 |
| 2.5 Statistische Auswertung..... | 20 |
| 2.6 TUNEL-Färbung | 20 |
| 2.7 Immunhistochemie für aktivierte Caspase 3 und den Fas Rezeptor | 21 |
| 2.8 Elektronenmikroskopie | 21 |
| 3. Ergebnisse | 23 |
| 3.1 Die Zytostatika Cyclophosphamid und Thiotepa rufen einen Zelluntergang im infantilen Rattengehirn hervor..... | 23 |
| 3.2 Quantifizierung der Zelldegeneration nach Gabe von Cyclophosphamid und Thiotepa im infantilen Rattengehirn..... | 26 |
| 3.3 Die ultrastrukturellen Merkmale der Zelldegeneration nach Cyclophosphamid | 30 |
| 3.4 Immunhistochemie für Caspase 3 und den Fas Rezeptor..... | 33 |
| 3.5 Dosisabhängigkeit der Schädigung durch Cyclophosphamid und Thiotepa..... | 34 |
| 3.6 Altersabhängigkeit der Schädigung durch Cyclophosphamid | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Diskussion..... | 37 |
| 4.1 Allgemeine Betrachtung | 37 |
| 4.2 Neurotoxizität von Cyclophosphamid und Thiotepa..... | 37 |
| 4.2.1 Exzitotoxizität | 37 |
| 4.2.2 Caspase-vermittelter Zelltod (Apoptose) | 38 |
| 4.3 Dosisabhängigkeit der neurotoxischen Wirkung der Zytostatika..... | 40 |
| 4.4 Altersabhängigkeit der neurotoxischen Wirkung | 41 |
| 4.5 Wirkungsverstärkung der Neurotoxizität | 41 |
| 4.6 Klinische Aspekte..... | 42 |
| 4.7 Fehlermöglichkeiten | 43 |
| 4.8 Ausblick..... | 43 |
| 5. Zusammenfassung | 44 |
| 6. Literaturverzeichnis | 46 |
| 7. Anhang..... | 55 |
| 7.1 Publikationen | 55 |
| 7.2 Eidesstattliche Erklärung | 56 |
| 7.3 Danksagung | 57 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Begriff |
|--------------|--|
| ALL | Akute lymphoblastische Leukämie |
| AMPA | α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure |
| Apaf 1 | Apoptotic protease activating factor 1 |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCL-2 Gruppe | Proteinfamilie mit anti- und proapoptischen Mitgliedern, BCL steht für Burkitt cell lymphoma |
| DISC | Death initiating signaling Complex |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EAA | Rezeptoren exzitatorischer Aminosäuren |
| FADD | Fas associated death domain |
| FAS | Zelltodrezeptor, Synonym CD 95 |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| i.m. | Intramuskulär |
| i.p. | Intraperitoneal |
| i.v. | Intravenös |
| MK 801 | Dizozilpinmaleat |
| MTX | Methotrexat |
| NAD | Nicotinamid-adenin-dinucleotid |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| PARP | Poly (ADP-ribose) Polymerase |
| PCD | Programmierter Zelltod |
| SEM | Standard error of the mean |
| TNF | Tumor Nekrose-Faktor |
| TUNEL | Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling |
| ZNS | Zentralnervensystem |

1. Einleitung

Die Therapie maligner Tumoren im Kindesalter hat in den letzten Jahren eine große Entwicklung erfahren. Als Komplikation oder Spätfolge einer zytostatischen Therapie kommt es immer häufiger zu irreversiblen Schäden des Zentralnervensystems (ZNS). Die Behandlung dieser Komplikationen beschränkt sich auf symptomatische Maßnahmen, da spezifische neuroprotektive Maßnahmen in der klinischen Praxis nicht zur Verfügung stehen. Das kindliche ZNS kann zwar, bis zu einem gewissen Ausmaß, erworbene strukturelle Läsionen durch Ausnutzung der Plastizität neuronaler Verbindungen kompensieren, ein Ersatz verlorener Nervenzellen ist jedoch nicht möglich. So führen erworbene Hirn- und Rückenmarksläsionen zu Schäden, die das Kind ein ganzes Leben begleiten. Voraussetzung für die Entwicklung neuroprotektiver Therapien im Kindesalter ist die Kenntnis über die Pathophysiologie des neuronalen Zelluntergangs. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht ob die Zytostatika Cyclophosphamid und Thiotepa eine Neurodegeneration im infantilen Rattengehirn induzieren.

1.1 Maligne Tumorerkrankungen im Kindesalter

Maligne Tumorerkrankungen stellen bei Kindern, nach Unfällen, die zweithäufigste Todesursache dar. Jährlich erkranken in Deutschland etwa 2000 Kinder an malignen Neoplasien [Creutzig, 2005; Kaatsch P, 2002; Tallen, 2003]. Der Erkrankungsgipfel liegt im Säuglingsalter. Jungen erkranken 1,2-fach häufiger als Mädchen.

Verschiedene Formen der Leukämie machen ein Drittel der Neuerkrankungen aus. Zu den weiteren häufigen Diagnosegruppen zählen die Hirntumoren (20%) und Lymphome (12,7%). Betrachtet man die Einzeldiagnosen so treten am häufigsten die akute lymphoblastische Leukämie (ALL, 27,9%), das Neuroblastom (8,6%), das Astrozytom (8,5%), das Nephroblastom (Wilms Tumor, 6,1%) und das Non-Hodgkin-Lymphom (6,5%) auf [Creutzig, 2005; Gurney, et al., 1995; Tallen, 2003].

In den ersten fünf Lebensjahren ist das Risiko, an Krebs zu erkranken etwa doppelt so groß wie im späteren Kindesalter. Dies weist darauf hin, dass ein großer Teil von Tumoren im Kindesalter pränatal gebildet wird. Diese Tumoren bezeichnet man als embryonale Tumoren. Zu ihnen zählt das Neuroblastom, Nephroblastom, Medulloblastom, Retinoblastom, Rhabdomyosarkom, Keimzelltumoren und das Hepatoblastom. Bei Jugendlichen hingegen treten eher Knochentumoren und Hodgkin-Lymphome auf.

Erfreulicherweise haben sich die Behandlungsmöglichkeiten und Überlebensraten für Kinder mit malignen Tumorerkrankungen in den letzten Jahrzehnten erheblich verbessert [Creutzig, 2005]. Aufgrund ihres Wachstumsverhaltens sind die Tumoren des Kindesalters oft einer kurativen Therapie zugänglich. Operative Resektion, Radiotherapie und zytostatische Therapie sind mögliche Therapieoptionen.

Die Entwicklung spezifischer Therapieformen, wie z.B. der Einsatz von Hochdosischemotherapie mit einer anschließenden Knochenmarkstransplantation, haben die Überlebenschancen deutlich verbessert [Graham, et al., 1997]. Durch die Anwendung einer hochdosierten Zytostatikatherapie können heute z.B. bei Kindern mit prä-B/T ALL Heilungsraten bis zu 80% erzielt werden [Henze, 1997; Henze, et al., 1981; Ravindranath, 2003; Rubnitz und Pui, 2003].

Auch bei Hirntumoren, wie dem Medulloblastom, hat die zytostatische Therapie Eingang in Therapieprotokolle gefunden [MacDonald, et al., 2003; Packer, 1995]. Besonders bei kleinen Kindern versucht man zunehmend, zur Vermeidung neuropsychologischer Spätfolgen, die Radiatio durch potente zytostatische Therapien verzichtbar zu machen. Im Hirntumorprotokoll HIT 2000 erhalten Kinder unter 4 Jahren mit Medulloblastom ohne Metastasen keine Bestrahlung [Rutkowski, 2003].

Die verbesserten Überlebensraten haben dazu geführt, dass ein zunehmendes Augenmerk auf die Spätfolgen der Therapien gelegt wurde. Dabei wurde auch festgestellt, dass Zytostatika zu einer signifikanten Neurotoxizität führen können [Hussain, et al., 1993; Verstappen, et al., 2003]. Die am häufigsten vorkommenden neurologischen Komplikationen umfassen akute Bewusstseins Einschränkungen, zerebrale Krampfanfälle, zerebrale Infarkte, Paralysen, Neuropathien, Leukenzephalopathien und die Ototoxizität [Reddy und Witek, 2003].

Auf dem Gebiet der zytostatischen Therapie von Hirntumoren wird zusätzlich an der Entwicklung von Methoden gearbeitet, die eine bessere Penetration der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen [Boaziz, et al., 1991; Inamura, et al., 1994; Jain, 1989; MacDonald, et al., 2003; Shapiro, et al., 1992]. Hohe Konzentrationen der Zytostatika im ZNS führen jedoch auch zu einer Zunahme neurologischer Nebenwirkungen [Garcia-Tena, et al., 1995; Mizutani, 1995; Steinberg, et al., 1998]. Bei der intrathekalen Gabe von Zytostatika, wie es im Fall der ALL in den heutigen Protokollen mit Methotrexat (MTX) gehandhabt wird, kommt es immer wieder zu neurologischen Komplikation. Hierbei reicht die Variation von Enzephalopathie mit oder ohne psychotischen Begleitsymptomen, Vigilanzstörungen, Krampfanfällen, Paresen, kortikaler Blindheit, Tremor, Ataxie, Neuropathien bis zu tödlich verlaufenden Leukenzephalopathien

[Asato, et al., 1992; Forman, 1990; Highley, et al., 1992; Hook, et al., 1992; Kaplan und Wiernik, 1982; Yim, et al., 1991]. Bis heute existiert keine kausale Therapie, durch die der Untergang betroffener Nervenzellen verhindert werden kann.

Im Erhaltungstherapie-Arm der Hirntumorstudie HIT 91 trat in 30% der Fälle Neurotoxizität und in 35% Ototoxizität auf. In 61% der Fälle kam es aus unterschiedlichen Toxizitätsgründen zu Dosismodifikationen oder Auslassung der zytostatischen Therapie.

Langzeitstudien zeigen, dass eine zytostatische Therapie, die Entwicklung kognitiver Fähigkeiten negativ beeinflusst [Brown, et al., 1999; Robison und Bhatia, 2003]. Noch schlechtere Ergebnisse fanden sich bei der Kombination von zytostatischer Therapie und Bestrahlung oder im Rahmen einer Knochenmarkstransplantation [Simms, et al., 2002]. In prospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass bei Kindern unter drei Jahren kognitive Fähigkeiten und das Sozialverhalten nach einer Knochenmarkstransplantation deutlich beeinträchtigt waren [Kramer, et al., 1997; Palmer, et al., 2001; Phipps, et al., 2000; Simms, et al., 2002].

Im Folgenden werden die toxischen Wirkungen der Zytostatika auf das infantile Gehirn in Hinblick auf die klinischen Auswirkungen und die möglichen zugrunde liegenden Pathomechanismen näher betrachtet.

1.2 Die Periode des rapiden Hirnwachstums (Brain growth spurt period)

Bereits 1974 wurde von Dobbing beschrieben, dass das Säugergehirn in seiner Entwicklung eine Phase rapiden Wachstums durchläuft. Die Phase wurde von Dobbing „*brain growth spurt period*“ genannt. Die Lebensphase, die mit diesem rapiden Hirnwachstum korreliert, findet bei verschiedenen Spezies zu unterschiedlichen Zeiten statt. Beim Menschen beginnt sie bereits im sechsten Schwangerschaftsmonat und endet zu Beginn des dritten Lebensjahres. Die Hirnwachstumsgeschwindigkeit folgt einem sigmoidalen Kurvenverlauf und ist zum Zeitpunkt der Geburt am höchsten.

Wichtige Vorgänge, wie Migration und Differenzierung von Nervenzellen, Synaptogenese aber auch physiologischer Zelltod (Apoptose) spielen sich während der Phase des rapiden Hirnwachstums ab. Dementsprechend empfindlich ist das Gehirn gegenüber äußeren Einwirkungen [Dobbing, 1974].

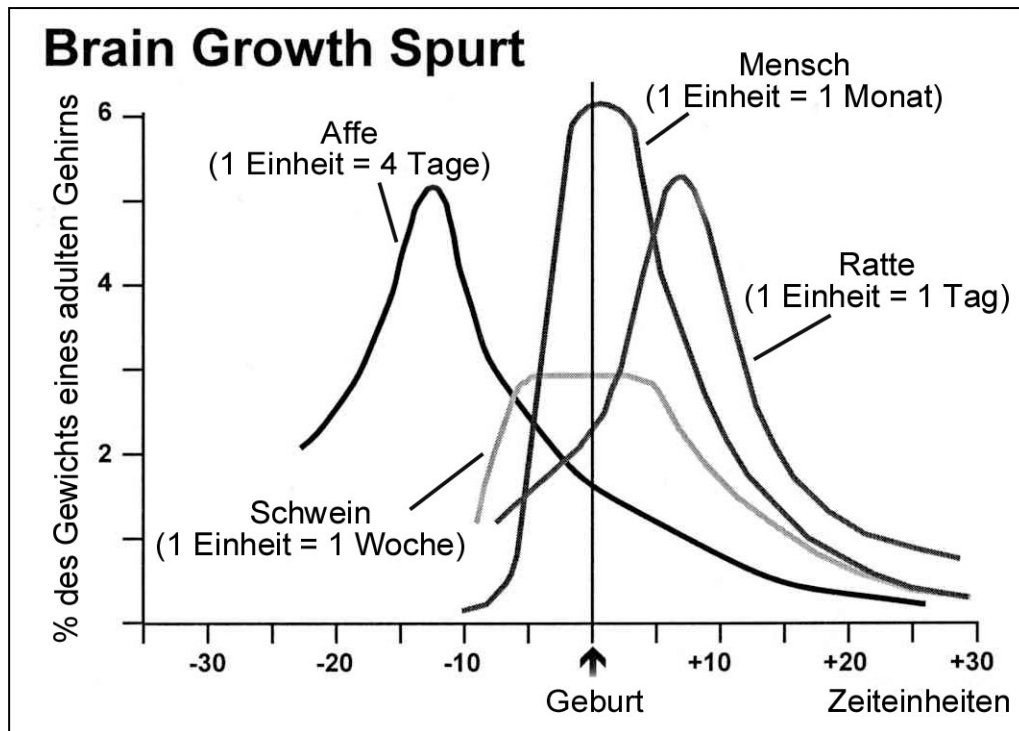


Abbildung 1: Die Periode des rapiden Hirnwachstums „Brain growth spurt period“ beim Menschen, beim Affen, beim Schwein und bei der Ratte [Dobbing, 1974]

Um Vorgänge zu simulieren, die sich im menschlichen Gehirn während der Periode des rapiden Hirnwachstums abspielen, wird die Ratte während der vergleichbaren ontogenetischen Phase als Tiermodell benutzt. Bei der Ratte beginnt die Phase des rapiden Hirnwachstums postnatal und umfasst die drei ersten Lebenswochen. Die maximale Hirnwachstumsgeschwindigkeit bei der Ratte wird zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag beobachtet.

1.3 Pathophysiologie der zentralnervösen Toxizität der Zytostatika

Die Pathogenese der neuro- und gliotoxischen Wirkung von Zytostatika wurde bisher nur in wenigen tierexperimentellen Studien untersucht. Bregman et al. haben an Mäusen gezeigt, dass Etoposid und BMY-40481 eine progrediente Ataxie und motorische Ausfälle durch eine Degeneration dorsaler Ganglienzellen induzieren können [Bregman, et al., 1994]. Wallace und Johnson zeigten an Ganglienzellen von Hühnerembryonen, dass Cytosin-Arabinosid auch auf postmitotische Zellen toxisch wirkt [Bregman, et al., 1994; Wallace und Johnson, 1989]. Sie führten dies auf eine Hemmung des 2'-Deoxycytidin-abhängigen DNA-Reparaturmechanismus

zurück. Die Dosisabhängigkeit der Neurotoxizität von Cyclophosphamid konnte tierexperimentell demonstriert werden [Fuchs, et al., 1990].

El Badawi et al. beschrieben die histopathologischen Veränderungen des Kleinhirns von Meerschweinchen nach niedrig dosierter Methotrexatgabe [el-Badawi, et al., 1990]. Es fanden sich bei allen Tieren, die Methotrexat erhalten hatten, degenerierende Purkinje Zellen sowie eine Proliferation der Astrozyten und ein perivaskuläres Ödem. Für die Methotrexat-Toxizität wurden als mögliche Mechanismen Folat-Reduktionen im ZNS-Gewebe, relative Cystein-Erhöhungen mit vermehrt anfallenden exzitatorischen Aminosäuren sowie Veränderungen des Biopterin- und Adenosin-Stoffwechsels erwogen [Whitehead, et al., 1992].

W. Rzeski et al. setzte Neuronen- und Gliazellkulturen Cisplatin, Cyclophosphamid, Methotrexat, Vinblastin und Thiotepa aus. Es konnte ein dosisabhängiger Zelluntergang, hauptsächlich in der Neuronenzellkultur, gezeigt werden. Die *in vitro* Neurotoxizität, nicht jedoch die Gliotoxizität, konnte signifikant durch Glutamat in einer nicht toxischen Konzentration potenziert werden. Der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Antagonist MK 801, der α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA) Antagonist GYKI 52466 und der Caspase-3 Inhibitor Ac-DEVD-CHO verminderten die Neurotoxizität von Cisplatin, Cyclophosphamid, Methotrexat, Vinblastin und Thiotepa [Rzeski, et al., 1998; Rzeski, et al., 2004].

Die Erforschung der Pathophysiologie der neuro- und gliotoxischen Wirkung der Zytostatika stellt angesichts der neuen Entwicklungen auf dem Gebiet der Hochdosischemotherapie ein wichtiges Ziel dar. Sie kann potentiell zur Entwicklung gezielter neuro- und glioprotektiver Therapien führen, welche additiv eingesetzt werden können, um das Nervensystem zu schützen.

In vielen akuten und chronischen neurologischen Schädigungsmustern, wie z.B. Ischämie, Trauma, Status epilepticus und Neurodegeneration im Rahmen mitochondrialer Dysfunktionen führen toxische Stimuli über zwei bereits gut beschriebene Mechanismen zum neuronalen Zelltod [Bossy-Wetzel, et al., 2003; Lipton und Rosenberg, 1994; Murphy, et al., 1999; Olney, 2003].

1.4 Exzitotoxizität

Die Exzitotoxizität ist eine passive Form des neuronalen Zelltods. Unter pathologischen Bedingungen kann eine Übererregung von Rezeptoren exzitatorischer Aminosäuren (EAA) den neuronalen Zelltod verursachen [Lipton und Rosenberg, 1994; Murphy, et al., 1999]. Die drei Subtypen der EAA-Rezeptoren, N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), α -Amino-3-hydroxy-5-

methyloxazol-4-propionsäure (AMPA) und Kainat Rezeptoren, sind an einen Ionenkanal gekoppelt und werden deshalb als ionotrope Rezeptoren bezeichnet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Übererregung ionotroper Glutamatrezeptoren *in vitro* und *in vivo* zum exzitotoxischen neuronalen Zelltod führt [Lipton und Rosenberg, 1994; Olney, 2003; Rothman und Olney, 1995].

Ishimaru und Mitarbeiter beschrieben die lichtmikroskopisch erkennbaren und die ultrastrukturellen Veränderungen im Gehirn von Nagetieren und Primaten nach der subkutanen Applikation von Natriumglutamat [Ishimaru, et al., 1999].

Makroskopisch nehmen die betroffenen Hirnareale ein spongiformes Aussehen an. Die Neurone schwellen an, das Chromatin verklumpt und der Kern schrumpft zusammen (Kernpyknose). Elektronenmikroskopisch werden die ersten Veränderungen an den Dendriten sichtbar, die in erheblichem Maße dilatieren, während die Axone unverändert bleiben. Die zytoplasmatischen Organellen verändern sich ebenfalls, das endoplasmatische Retikulum vakuolisiert und zerfällt. Die Mitochondrien schrumpfen zunächst, um dann ödematös anzuschwellen.

Die Kernbestandteile zeigen erst Veränderungen, wenn die übrigen Organellen bereits verändert sind. Das Chromatin verklumpt und wandert zur Kernmembran. Anschließend verschmilzt es zu einer einzigen elektronendichten Masse. Zum Schluss werden die Zellen von benachbarten Phagozyten aufgenommen und abgebaut.

Die Exzitotoxizität ist an zahlreichen akuten und chronischen neurologischen Krankheitsbildern beteiligt. Rothman und Mitarbeiter konnten als erste zeigen, dass anoxische Zellkulturen aus dem Hippocampus exzitatorische Neurotransmitter freisetzen [Rothman, 1984]. Direkt gemessen werden konnte der extrazelluläre Glutamatanstieg in *in vivo* Mikrodialyse- Experimenten. Dies war in Modellen der globalen Ischämie [Benveniste, et al., 1984; Globus, et al., 1988], Modellen der fokalen Ischämie [Miyashita, et al., 1994; Uchiyama-Tsuyuki, et al., 1994] und Modellen der perinatalen Asphyxie/Ischämie [Silverstein, et al., 1986] möglich.

An kortikalen Nervenzellkulturen konnten Tecoma und Mitarbeiter nachweisen, dass durch ein Trauma, über die Aktivierung von NMDA Rezeptoren eine Kaskade in Gang gesetzt wird, die weit über die Dauer des eigentlichen Ereignisses hinaus Neuronen schädigt [Tecoma, et al., 1989]. Mit Hilfe von Mikrodialyseuntersuchungen an Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma konnte ein Anstieg der Konzentration exzitatorischer Aminosäuren im extrazellulären Raum nachgewiesen werden [Persson und Hillered, 1992].

1.5 Apoptose

Das Phänomen der Apoptose ist seit mehr als hundert Jahren bekannt (Vogt 1842; [Lawen, 2003; Vaux und Korsmeyer, 1999]. Der Begriff der Apoptose wurde 1972 von Kerr geprägt und als aktive Form des Zelltodes neben der Nekrose definiert [Kerr, et al., 1972]. Seit den 1970er Jahren werden die Auslöser und die genetische Regulation der Apoptose systematisch untersucht [Hengartner, 2000; Kerr, et al., 1972]. Als Modellorganismus diente der Nematode *Caenorhabditis elegans*. Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Aspekte herausgegriffen.

1.5.1 Morphologische Kennzeichen der Apoptose

Die Apoptose stellt bei mehrzelligen Organismen eine aktive Form des Zelltodes dar, die in biologischen Prozessen der embryonalen Entwicklung, der Zell- und Organdifferenzierung und der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielt. In den letzten Jahren konnte durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Traumata, Ischämien, prolongierte Krampfanfälle oder eine Bestrahlung Apoptose im Gehirn induzieren [Borovitskaya, et al., 1996; Choi, 1996; Colicos und Dash, 1996; Crowe, et al., 1997; Ikonomidou, et al., 1999; Liu, et al., 1997; Thompson, 1995].

Die molekularen Mechanismen, die zur Apoptose von Nerven- und Gliazellen führen, sowie die Entwicklung antiapoptotisch wirksamer Medikamente sind Gegenstand intensiver Forschung. Als gesichert gilt, dass verschiedene äußere Faktoren, sowohl physikalischer als auch chemischer Natur, rezeptorvermittelt eine *de novo* Proteinsynthese induzieren können, die dann den Tod der Zelle in Gang setzen. Morphologische Kriterien derartig untergehender Zellen sind primäre DNA-Fragmentation in ca. 180 bp-Abschnitte, die Kondensation von Nukleus und Zytoplasma mit der Bildung apoptotischer Körperchen und die Phagozytose der Zellreste ohne inflammatorische Reaktion [Steller, 1995].

An Hand dieser morphologischen Kriterien kann man die Apoptose von der Nekrose abgrenzen. Die von Ishimaru und Mitarbeitern [Ishimaru, et al., 1999] beschriebenen Veränderungen werden als Referenzstandard benutzt, um neuropathologische Veränderungen als apoptotisch einzuordnen.

1.5.2 Die genetische Regulation der Apoptose

Die apoptotische Zelltodkaskade wird von einem intra- oder einem extrazellulären Triggerfaktor in Gang gesetzt, dementsprechend spricht man vom extrinsischen oder intrinsischen Weg.

Die Rezeptoren, die den extrinsischen Weg triggern sind in der Plasmamembran der Zelle verankert und werden durch extrazelluläre Liganden aktiviert. Als typische initiale Signale sind die Bindung des Tumor Nekrose-Faktors (TNF) an den p55-TNF-Rezeptor (oder CD120a) bzw. die Bindung des Proteins FAS/Apo1 an den FAS/Apo1- (oder CD95) Rezeptor nachgewiesen worden [Barinaga, 1996; Wallach, 1997]. Die Schlüsselenzyme, die die Apoptose induzieren und ausführen sind die Caspasen, aus der Gruppe der Cystein-Proteasen [Wallach, 1997]. Die zytotoxische Wirkung vieler Zytostatika beruht ebenfalls auf ihrer Fähigkeit das System der Caspasen zu aktivieren [Kim, et al., 2002; Solary, et al., 2000]. Es konnte gezeigt werden, dass Zytostatika eine Hoch-Regulation von FasL induzieren. Im Folgenden kommt es zu einer Interaktion von FasL und Fas auf der Oberfläche von Tumorzellen [Friesen, et al., 1996; Fulda, et al., 2000; Muller, et al., 1998].

Der intrinsische- oder auch mitochondriale Weg wird durch eine Reihe extra- oder intrazellulärer Zellstressfaktoren, einschließlich dem oxidativen Stress und der Behandlung mit zytotoxischen Stoffen in Gang gesetzt. Es kommt zu einer Freisetzung von Cytochrom-c aus der inneren Mitochondrienmembran in das Zytosol, wo es an den Apoptotic Protease Activating Factor-1 (Apaf1 oder CED-4) gebunden wird [Bossy-Wetzel, et al., 2003; Murphy, et al., 1999]. Die Bindung von Cytochrom-c an Apaf-1 triggert die Bildung des Apoptosom welches wiederum die Aktivierung der Caspasen zu Folge hat. Im Anschluss kann eine Effektorcaspase aktiviert werden, welche die nötigen zellulären Substrate spaltet die zum Ausführen der Apoptose nötig sind. Diese molekularen Mechanismen konnten auch unter dem Einfluss von Zytostatika beobachtet werden [Hu, et al., 1999; Li, et al., 1997].

Andere frühe intrazelluläre Signale des programmierten Zelltodes bestehen in der vermehrten Expression des Tumor-Suppressor-Gens p53, des Proto-Onkogens c-myc und der Transkriptionsfaktoren c-jun und c-fos [Bossy-Wetzel, et al., 1997; Williams und Smith, 1993].

Nach erfolgtem Signal zur Initiierung des programmierten Zelltodes folgt in der Kaskade eine Phase der Kontrolle und möglichen Modifikation, die intrazellulär stattfindet [Golstein, 1997]. Diese spätere Phase ist vor allem durch die Aktivierung der Caspasen und deren Beeinflussung durch die Proteine der Bcl-2Gruppe charakterisiert [Kroemer, 1997].

Als apoptosefördernd ließen sich unter anderem folgende Gene und Proteine nachweisen: Bax, Bad, Bak, Bcl-Xshort und die Cystein-Proteasen ICE oder Caspase 1, CPP32 oder Caspase 3 sowie CED-4 des Nematoden *C. elegans*. Als antiapoptotisch erwiesen sich Bcl-2 und das alternative splicing-Produkt des Gens Bcl-x, Bcl-Xlong [Golstein, 1997].

1.6 Die Zytostatika Cyclophosphamid und Thiotepa

Cyclophosphamid und Thiotepa sind Zytostatika aus der Gruppe der alkylierenden Verbindungen. Die alkylierenden Verbindungen waren die ersten nicht hormonellen Zytostatika, die erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt wurden [Colvin, 1999]. Die Substanzen sind in der Lage mit vielen Zellbestandteilen und in jedem Stadium des Zellzyklus chemisch zu reagieren. Die einzelnen Substanzen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aktivität im Tumorgewebe und ihrer Toxizität im gesunden Gewebe.

1.6.1 Cyclophosphamid

Cyclophosphamid wurde 1958 als Tumorthapeutikum eingeführt und gehört auch heute noch zu den wichtigsten Alkylantien [Aktories, et al., 2005]. Es besitzt den höchsten therapeutischen Index und das breiteste Tumorspektrum. Als Zytostatikum ist es ein fester Bestandteil in der Therapie von Lymphomen, insbesondere dem Non-Hodgkin Lymphom, Leukämien und solider Tumoren, wie zum Beispiel dem Medulloblastom im Kindesalter und dem Mammakarzinom im Erwachsenenalter. Als Hochdosistherapie wird es in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung in der Knochenmarkstransplantation eingesetzt. Eine weitere Anwendung findet Cyclophosphamid in der immunsuppressiven Therapie verschiedener autoimmunologischer Erkrankungen [Aktories, et al., 2005; Perry, 2001].

Die Muttersubstanz ist inaktiv und wird in der Leber durch Hydroxylierung (Cytochrom P- 450-Enzyme) aktiviert bevor sie in eine zytotoxische Form metabolisiert werden kann. Der zytotoxische Wirkmechanismus besteht aus Vernetzungen zwischen DNA Strängen.

Cyclophosphamid kann oral, intramuskulär (i.m.) und intravenös (i.v.) appliziert werden. Es passiert nicht die Blut-Hirn-Schranke. Seine Plasmahalbwertszeit beträgt 6,5 h bei einer intravenösen Gabe von 6-80 mg. Nur 10-15% der zirkulierenden Muttersubstanz ist protein-gebunden, dagegen 50% der alkylierten Metaboliten. Die Ausscheidung von Cyclophosphamid erfolgt hauptsächlich über die Nieren. Die häufigsten bekannten Nebenwirkungen bestehen in der Suppression des Knochenmarkes, Übelkeit, Alopezie und hämorrhagischer Zystitis. Aufgrund seiner Metabolisierung in der Leber kann es zu verschiedenen Interaktionen mit anderen Substanzen kommen.

Üblich sind intravenöse Gaben von 3-6 mg/kg/d oder 120-240 mg/m²/d in der Therapie von Lymphomen, Myelomen und der chronischen Immunsuppression.

1.6.2 Thiotepa

Thiotepa wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit zu den Ethylenimonium-Ionen als Zytostatikum entwickelt, die von den „Nitrogen Mustards“ produziert werden. Es hat eine geringere Wirksamkeit als die „Nitrogen Mustards“, trotzdem wird ein ähnlicher Wirkmechanismus angenommen. Thiotepa wird ebenfalls in der Lymphomtherapie als auch bei Ovarial- und Mammakarzinomen eingesetzt [Perry, 2001].

Die Halbwertszeit nach i.v. Gabe liegt unter 2 h. 60-80% werden über die Nieren ausgeschieden. Die häufigsten bekannten Nebenwirkungen sind Knochenmarksdepression und Übelkeit. Im Rahmen einer Hochdosismethotherapie mit anschließender Knochenmarkstransplantation kann es zu schweren neurologischen Nebenwirkungen kommen. Diese können von Somnolenz über Krampfanfälle bis hin zum Koma reichen. Die intrathekale Gabe von Thiotepa (10 mg/m²) kann beim Menschen schwere Radikulomyelopathien induzieren [Keime-Guibert, et al., 1998]. Übliche intravenöse Dosierungen sind 0,2 mg/kg/d oder 12-16mg/m²/d.

1.7 Formulierung der zentralen Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wird untersucht ob die Zytostatika Cyclophosphamid und Thiotepa eine Neurodegeneration im infantilen Rattengehirn induzieren. Dabei soll die Rolle der Exzitotoxizität und der Apoptose ermittelt werden. Ziel soll das Verständnis über die Pathogenese der Neurotoxizität im juvenilen ZNS nach zytostatischer Therapie sein. Ferner soll die Arbeit Grundlagen für die Entwicklung neuroprotektiver Therapiekonzepte, bei Kindern die einer zytostatischen Therapie unterzogen werden, schaffen.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeworfenen Fragestellungen berühren den histologisch nachweisbaren Zelluntergang nach Zytostatika-Applikation im infantilen Rattengehirn. Hierzu werden histologische und morphometrische Untersuchungsmethoden verwendet. Dosis-Wirkungsbeziehungen werden beschrieben, so wie Zeitverlauf der Schädigung, die Altersabhängigkeit und die Verteilung auf 14 ausgewählte Hirnregionen.

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuche: Tiere, Injektionen, ethische Richtlinien

Han Wistar-Ratten im Alter von 7, 14, 21 und 28 Tagen wurden für die Versuche benutzt. Geliefert wurden die Tiere vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV). Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien von Tierversuchen der Society for Neuroscience durchgeführt [Society of Neuroscience, Polycy of Ethics]. Die Tiere wurden in gut belüfteten Käfigen gehalten und mit artgerechter Nahrung und Wasser ad libitum versorgt. Bis zum Zeitpunkt der Perfusion, blieben die juvenilen Ratten bei ihren Muttertieren. Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für technische Sicherheit und Arbeitsschutz Berlin überprüft und genehmigt.

Den Tieren wurde im Alter von 7, 14, 21 und 28 Tagen die zu testenden Medikamente oder isotone Kochsalzlösung intraperitoneal (i.p.) injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 10 ml/kg Körpergewicht. Die Tiere wurden nach einer Beobachtungszeit ihren Müttern zurückgegeben, um für sie den Stress so gering wie möglich zu halten und einer möglichen Hypothermie vorzubeugen. Um Verzerrungen durch Mangelernährung zu vermeiden, wurden die Wurfgrößen zwischen zehn und fünfzehn Wurfgeschwistern gehalten. Sowohl die Tiere, die mit Kochsalzlösung behandelt wurden, als auch die Tiere, welche Cyclophosphamid und Thiotepa erhielten, waren Wurfgeschwister, und wurden gemeinsam unter den gleichen Bedingungen gehalten. Tieren der Kontrollgruppe wurde isotone Kochsalzlösung (Natriumchlorid per injectionem, Braun Ingelheim, Deutschland) intraperitoneal injiziert.

2.2 Perfusion, Einbettung, Schnitt

24 Stunden nach der Injektion wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Chloralhydrat (Braun, Ingelheim, Deutschland) getötet. Anschließend wurde das Herz und die Aorta ascendens frei präpariert. Nach einem breitem Einschnitt des rechten Vorhofes und einem Einschnitt der linken Herzkammer an der Kammerspitze, wurde sofort aber sehr behutsam die Perfusionskanüle in die Aorta vorgeschoben und das Tier darüber perfundiert.

Die Perfusionslösung bestand aus 4%igem Paraformaldehyd (Merck-Suchard, Hohenbrunn, Deutschland), gelöst in Phosphatpuffer (Sigma, St. Louis, USA, pH-Wert=7,4).

Nach vollendeter Perfusion wurden die Gehirne in toto behutsam aus dem Schädel präpariert und bis zur Färbung in 4%iger Paraformaldehydlösung nachfixiert. Anschließend wurden die Gehirne in reiner Phosphatpufferlösung gelagert.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Gehirne in Agar (Sigma, St. Louis, USA) eingebettet und am Rotationsvibrator (Typ OTS 3000, Electron Microscopy Sciences, USA) in 70µm dünne coronare Serienscheiben geschnitten.

Etwa jeder 7. Schnitt wurde zur Silberfärbung ausgewählt und zur Nachfixierung in 4%iger Paraformaldehydlösung eingelegt. Anschließend wurden die Schnitte nach dem De Olmos Protokoll gefärbt (siehe 2.3).

Tabelle 1: Übersicht über die durchgeführten Experimente, die verwendeten Dosierungen und Substanzen

| | | | | |
|------------------------|--|--|--|---|
| Substanz | Cyclophosphamid ICN, Irvine, CA | Cyclophosphamid ICN, Irvine, CA | Cyclophosphamid ICN, Irvine, CA | Cyclophosphamid ICN, Irvine, CA |
| Dosierung | 200mg/kg einmalig | 200mg/kg einmalig | 300mg/kg einmalig | 400mg/kg einmalig |
| Alter | 7 Tage | 7 Tage | 7 Tage | 7 Tage |
| Überlebenszeit | 24 Stunden | 24 Stunden | 24 Stunden | 24 Stunden |
| Färbung | De Olmos | De Olmos | De Olmos | De Olmos |
| Tierzahl/Gruppe | 5 | 3 | 5 | 4 |
| Substanz | Cyclophosphamid ICN, Irvine, CA | Cyclophosphamid ICN, Irvine, CA | Cyclophosphamid ICN, Irvine, CA | Cyclophosphamid ICN, Irvine, CA |
| Dosierung | 400mg/kg einmalig | 400mg/kg einmalig | 600mg/kg einmalig | 600mg/kg einmalig |
| Alter | 7 Tage | 7 Tage | 7 Tage | 14 Tage |
| Überlebenszeit | 4, 24 Stunden | 24 Stunden | 24 Stunden | 24 Stunden |
| Färbung | De Olmos Elektronenmikroskopie | Elektronenmikroskopie | De Olmos Elektronenmikroskopie | De Olmos |
| Tierzahl/Gruppe | 6 | 7 | 4 | 6 |
| Substanz | Cyclophosphamid ICN, Irvine, CA | Cyclophosphamid ICN, Irvine, CA | Cyclophosphamid ICN, Irvine, CA | Cyclophosphamid ICN, Irvine, CA |
| Dosierung | 600mg/kg einmalig | 600mg/kg einmalig | 600mg/kg einmalig | 600mg/kg einmalig |
| Alter | 21 Tage | 28 Tage | 7 Tage | 7 Tage |
| Überlebenszeit | 24 Stunden | 24 Stunden | 24 Stunden | 24 Stunden |
| Färbung | De Olmos | De Olmos | Immunhistochemie Caspase 3 | Immunhistochemie FAS |
| Tierzahl/Gruppe | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Substanz | Thiotepa Lederle Münster, Deutschland | Thiotepa Lederle Münster, Deutschland | Thiotepa Lederle Münster, Deutschland | |
| Dosierung | 15 mg/kg | 30 mg/kg | 45 mg/kg | |
| Alter | 7 Tage | 7 Tage | 7 Tage | |
| Überlebenszeit | 24 Stunden | 24 Stunden | 24 Stunden | |
| Färbung | De Olmos | De Olmos | De Olmos | |
| Tierzahl/Gruppe | 4 | 3 | 4 | |

2.3 De Olmos Kupfersilberfärbung

Die De Olmos Kupfersilberfärbung kann zur Darstellung von degenerierten Zellen und Axonen benutzt werden, die entweder durch Apoptose oder andere Mechanismen zu Grunde gehen. Die degenerierten Zellen färben sich dunkelbraun bis schwarz an und heben sich deutlich vom goldgelben Hintergrund ab [DeOlmos und Ingram, 1971]. Dies beruht auf einer Reaktion des Axoplasmas der degenerierten Neurone mit dem Silbersalz, welches aufgrund der durchlässig gewordenen Zellmembran in die Zellen eindringen kann. Die Färbung ist kostengünstig, leicht durchführbar und eignet sich besonders gut für Screeninguntersuchungen und, wie in diesem Fall, für Experimente, bei denen es auf große Fallzahlen ankommt.

Die De Olmos Kupfersilberfärbung sagt nichts über den Pathomechanismus aus, der zur neuronalen Degeneration geführt hat. Sie zeigt lediglich, dass Zellen zu Grunde gegangen sind. In dieser Arbeit wurde sie zur Übersichtsfärbung verwendet, um die Ausbreitung und numerische Dichte von degenerierten Zellen sichtbar zu machen.

Im ersten Arbeitsschritt wurden die Schnitte in einer Kupfer-Silber-Lösung für 48-72 Stunden im Dunkeln inkubiert. Die verwendete Lösung setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

1,5 g Silbernitrat, 3 ml 0,5%ige Kupfernitratlösung, 15 ml 0,1% Allantoinlösung, 9 ml Boratpuffer, 17 ml Ethanol absolut und 9 ml Pyridin.

Anschließend wurden die Schnitte mit reinem Aceton gewaschen und im nächsten Arbeitsschritt für 35 Minuten in einer Silber-Diamin Lösung inkubiert. Die Lösung bestand aus folgenden Komponenten:

24g Silbernitrat, 120 ml zweifach destilliertes Wasser, 60 ml 0,4%ige Natronlauge und 30 ml Ammoniak.

Zur Reduktion wurden die Schnitte unter Agitation in eine ethanolische Lösung aus Formaldehyd und Zitronensäure überführt. Die genaue Zusammensetzung war:

135 ml zweifach destilliertes Wasser, 15 ml Ethanol (100%, 180 µl 37%ige Formaldehydlösung und 10,5 mg Zitronensäure.

Im Anschluss wurden die Schnitte einzeln mit 0,3%iger Kaliumferrizyanidlösung gebleicht. Nach zweimaligem Waschen mit zweifach destilliertem Wasser wurden die Schnitte über eine Minute in 0,1%iger Natriumthiosulfatlösung gegeben um das Färbeergebnis zu stabilisieren. Nach Dehydration in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate mit Hilfe von Paramount-Medium auf Objektträger aufgebracht und mit Deckgläsern versehen.

2.4 Morphometrie

Im infantilen Rattengehirn können während der physiologischen Entwicklung apoptotische Vorgänge beobachtet werden. Deshalb ist eine genaue Quantifizierung des Ausmaßes der Degeneration bei mit Cyclophosphamid, Thiotepa und Plazebo behandelten Tieren notwendig.

Für diese Untersuchung wurde die stereologische Dissektionsmethode eingesetzt (unibased stereological dissector method) [Cruz_Orive und Weibel, 1990]. Ihr liegt die Aufspaltung des großen, „unzählbaren“ Gewebeblocks, in kleine, „zählbare“ Untereinheiten (Fractionation) zugrunde. Die Fragmente werden zufällig ausgewählt und mit Hilfe eines fixen Zählrahmens ausgezählt. Der Zählrahmen gibt die Ausdehnung in einer Ebene vor. Die dritte Dimension, die zur Beurteilung eines dreidimensionalen Objektes notwendig ist, wird durch die Dicke des Schnittes bestimmt. Das Ergebnis der ausgezählten Untereinheit wird mit der Gesamtzahl aller Untereinheiten multipliziert. Das Endresultat stellt die Zellzahl in einem bestimmten Gewebevolumen dar.

Der Zusatz „stereological dissector“ steht für die Möglichkeit mit dem Mikroskop, den Schnitt in verschiedenen Ebenen zu fokussieren.

Folgende Fehlerquellen dieser Methode müssen in Betracht gezogen werden: extrem inhomogene Verteilung der zu zählenden Objekte, Schwellung oder Schrumpfung des Gesamtvolumens. In diesen Fällen wurde ein 0,05 x 0,05 mm großer Zählrahmen verwendet.

Die Schnitthöhe betrug 0,07 mm. Acht bis zehn Felder wurden innerhalb einer Hirnregion zufällig ausgewählt und ausgezählt.

Die numerische Dichte normaler Neurone wurde an nach Nissl gefärbten Schnitten ermittelt (Methylenblau, Azur II). Das Ausmaß der Apoptose wird als Verhältnis der Anzahl degenerierter Zellen zur Gesamtzahl dargestellt und als Prozentwert ausgedrückt (Mittelwert +/- Standardfehler SEM). Die Dichte der degenerierten Zellen wurde für die einzeln ausgezählten Regionen festgehalten. In einem weiteren Schritt wurden die einzelnen Zelldichtewerte zu einem Gesamtscore summiert. Somit konnten Tiere aus Kontroll- und Versuchsgruppe an Hand eines einzelnen Wertes verglichen werden.

Folgende 14 Regionen wurden im Einzelnen ausgezählt:

- Hippocampus (CA 1)
- Gyrus dentatus
- Nucleus caudatus

- laterodorsaler, mediodorsaler und ventraler Thalamus
- frontaler Cortex (Lamina 2 und 4)
- Gyrus cinguli (Lamina 2 und 4)
- parietaler Cortex (Lamina 2 und 4)
- retrosplenialer Cortex (Lamina 2 und 4)

2.5 Statistische Auswertung

Die nach De Olmos gefärbten Präparate wurden verblindet ausgezählt und von erfahrenen Untersuchern kontrolliert. Das Ergebnis wurde als numerische Neuronendichte angegeben und entspricht degenerierten Neuronen pro Kubikmillimeter. Insgesamt wurden 14 verschiedene Hirnregionen ausgewertet. Die Ergebnisse der Einzelzählungen jeder Region wurden gemittelt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des Student's t-Test auf ihre Signifikanz hin überprüft. Die Untersuchungen zur Alters -und Dosisabhängigkeit der von Cyclophosphamid und Thiotepa verursachten Schäden wurde mit Hilfe der ermittelten Gesamtscores und der Varianzanalyse (ANOVA) überprüft.

2.6 TUNEL-Färbung

Während des apoptotischen Zelluntergangs kommt es zur Aufspaltung der nukleären DNA durch Endonukleasen in Fragmente von ca. 180 Basenpaaren Länge. Mit der TUNEL-Färbung lassen sich diese DNA-Fragmente nachweisen [Gavrieli, et al., 1992]. Das Enzym Terminaldesoxynucleotidyltransferase reagiert ausschließlich mit dem 3'-OH Ende der DNA und fügt an diese biotinylierte Polydesoxyuridylnukleotide an. Diese Biotinenden reagieren nun ihrerseits mit Avidin, das an eine Peroxidase gekoppelt ist. Diese Peroxidase katalysiert die Farbreaktion, die im histologischen Präparat sichtbar wird. Eine apoptotische Zelle ist mit der TUNEL-Methode für ca. ein bis drei Stunden nachweisbar.

Sieben Tage alte Tiere erhielten Natriumchlorid oder Cyclophosphamid intraperitoneal in einer Dosierung von 600 mg/kg Körpergewicht. Nach 24 Stunden wurden die Tiere mit einer Überdosierung Chloralhydrat getötet. Die Perfusion zur Vorbereitung der TUNEL -Färbung wurde wie bereits in Abschnitt 2.3 beschrieben durchgeführt. Die Gehirne für diese Färbung wurden in Paraffin eingebettet und am Vibratom (Microm, Waldorf, Deutschland) in einer Dicke von 10 µm geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Acht Schnitte und zwei Kontrollen wurden aus den Bereichen des Frontal -und Parietalhirns in denen in der Übersichtsfärbung Zelluntergang gesehen wurde, ausgewählt und gefärbt. Die Färbung der Gehirne wurde mit Hilfe

eines kommerziellen Kits (Apoptag, ONCOR Appligene, Heidelberg) durchgeführt und mit Methylgrün gegengefärbt. Das Ergebnis zeigte dunkelbraune Zellkerne in den Zellen, in denen es zur DNA-Fragmentierung gekommen war. Das Zytoplasma intakter Zellen färbte sich mit Methylgrün an.

2.7 Immunhistochemie für aktivierte Caspase 3 und den Fas Rezeptor

Wie in der unter 2.6 beschriebenen TUNEL- Färbung wurden auch für diese Färbung die Tiere vorbehandelt, die Gehirne in Paraffin eingebettet und am Mikrotom HM 360 (Microm, Waldorf, Deutschland) in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf mit 3- aminopropyltriethoxylane (Sigma, Deisenhofen, Germany) beschichtete Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden in 10 mM Zitratpuffer, pH 6,5 bei 750 W erhitzt. Die endogene Peroxidase Aktivität wurde mit 0,6% v/v Hydrogenperoxid für 15 min geblockt und im Anschluss mit Ziegenserum für 20 min inkubiert und über Nacht bei 4°C mit einem monoklonalen anti-Fas Antikörper (produziert in der Maus) (1:200, Transduction Laboratories, BD Biosciences, Heidelberg, Germany, 1:250) oder einem monoklonalen caspase 3 Antikörper (produziert im Kaninchen) (1:100, Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Germany) inkubiert. Eine zweite Inkubation erfolgte mit Hase Anti-Maus IgG und Ziege Anti-Hase. Die Kontrollen wurden mit den passenden Blockierungspeptiden nach Herstelleranweisungen behandelt. Nach der Detektion mit dem ABC Kit (Vector Laboratories, Peterborough, UK) wurden positive Zellen mit Diaminobenzidine (DAB, Sigma, Deisenhofen, Germany) sichtbar gemacht und mit Hematoxylin-Eosin leicht gegen gefärbt.

2.8 Elektronenmikroskopie

Die TUNEL-Methode alleine erlaubt keine definitive Aussage über die Art des Zelltodes, da auch im Rahmen von Nekrosen und Autolyse freie DNA-Enden vorkommen, die TUNEL-positiv reagieren [Charriaut_Marlangue und Ben_Ari, 1995; Grasl_Kraupp, et al., 1995]. Deshalb muss sie durch ultrastrukturelle Untersuchungen, in diesem Fall mit der Transmissionselektronenmikroskopie, ergänzt werden. Die Tierversuche wurden wie unter 2.1 durchgeführt. Perfundiert wie unter 2.2 beschrieben mit der Ausnahme, dass die Perfusionslösung aus 1,5%iger Glutaraldehydlösung in 0,1 M Pyrophosphatpuffer bestand. Die Gehirne wurden anschließend in 1 mm dünne Scheiben geschnitten, die Regionen in 1 x 3 mm große Rechtecke weiter eingegrenzt, in Osmium-Tetroxid fixiert und mit Alkohol dehydriert. Nach der Behandlung mit Toluol erfolgte die Einbettung in Epoxidharz. Am Ultramikrotom wurden 60-70 nm dünne

Schnitte angefertigt. Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleizitrat gefärbt und mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Die Zytostatika Cyclophosphamid und Thiotepa rufen einen Zelluntergang im infantilen Rattengehirn hervor

Vierundzwanzig Stunden nach der intraperitonealen Applikation von Cyclophosphamid (200-600 mg/kg) oder Thiotepa (15-45 mg/kg) fanden sich in den mit Silber und TUNEL gefärbten Hirnschnitten ausgeprägte degenerative Veränderungen im parietalen, cingulären und retrosplenialen Kortex, dem Gyrus dentatus und in geringerer Ausprägung in den thalamischen Kerngebieten und dem Nucleus caudatus (Abb. 2, 3, 4). Die Ausprägung der Schädigung nach der Applikation von Cyclophosphamid oder Thiotepa zeigte eine Dosisabhängigkeit.

Für die mit Thiotepa (45 mg/kg KG zum Zeitpunkt 24 Stunden) behandelten Tiere fand sich ein ähnliches Bild (Abb. 5) und ebenfalls eine Dosisabhängigkeit bezüglich der Ausprägung der Gehirnschädigung.

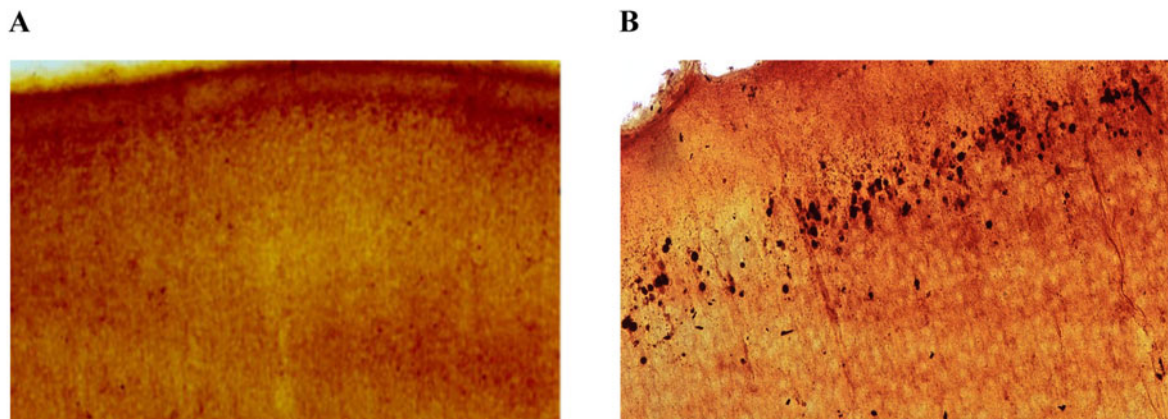


Abbildung 2: Detailaufnahme aus den Laminae II und IV des Cortex parietalis acht Tage alter Ratten 24 Stunden nach Behandlung mit Placebo (A) oder Cyclophosphamid 600 mg/kg KG (B): Placebo (Natriumchlorid) oder Cyclophosphamid 600 mg/kg KG (zum Zeitpunkt 0) wurden Ratten am siebten Lebenstag intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden am achten Lebenstag getötet und perfundiert. Die histologischen Schnitte wurden nach De Olmos gefärbt. Die dunkel angefärbten Punkte zeigen degenerierte Zellen. In den mit Placebo behandelten Tieren ist die Zahl degenerierter Zellen im parietalen Cortex sehr gering und zum Teil fast gar nicht nachweisbar. Das Gehirn der mit Cyclophosphamid behandelten Ratten (B) zeigt dagegen deutlich mehr dunkle (degenerierte) Zellen in der Lamina II des parietalen Cortex. Vergleich zum gleichaltrigen, mit Natriumchlorid behandelten Tier (A). Vergrößerungsfaktor x 100.

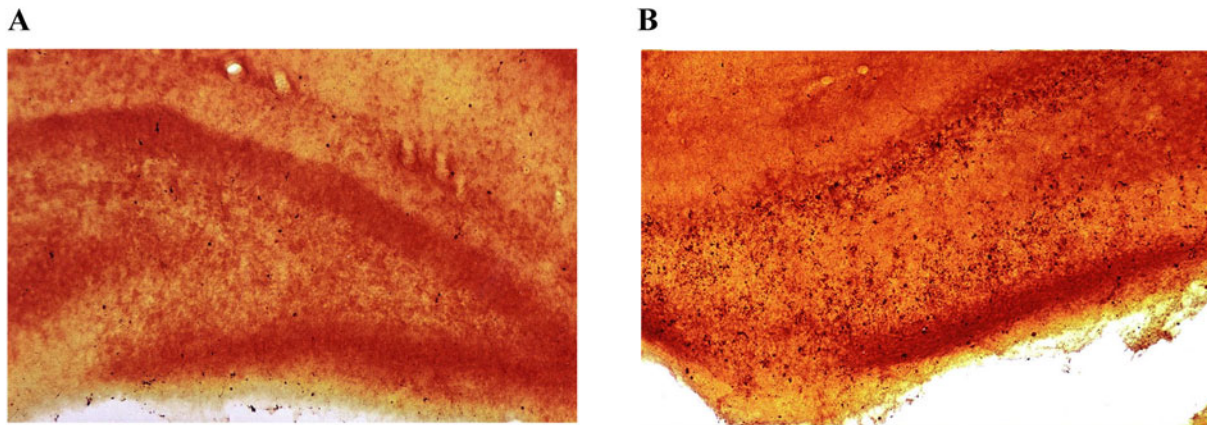


Abbildung 3: *Detailaufnahme aus dem Gyrus dentatus acht Tage alter Ratten 24 Stunden nach Behandlung mit Placebo (A) oder Cyclophosphamid 600 mg/kg KG (B):* Placebo (Natriumchlorid) oder Cyclophosphamid 600 mg/kg KG (zum Zeitpunkt 0) wurden Ratten am siebten Lebenstag intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden am achten Lebenstag getötet und perfundiert. Die histologischen Schnitte wurden nach De Olmos gefärbt. Die dunkel angefärbten Punkte zeigen degenerierte Zellen. In den mit Placebo behandelten Tieren (A) ist die Zahl degenerierter Zellen im Gyrus dentatus sehr gering und zum Teil fast gar nicht nachweisbar. Das Gehirn der mit Cyclophosphamid behandelten Ratte (B) zeigt dagegen deutlich mehr dunkle (degenerierte) Zellen im Hilus und den Körnerzellen des Gyrus dentatus. Vergleich zum gleichaltrigen, mit Natriumchlorid behandelten Tier (A). Vergrößerungsfaktor x 100.

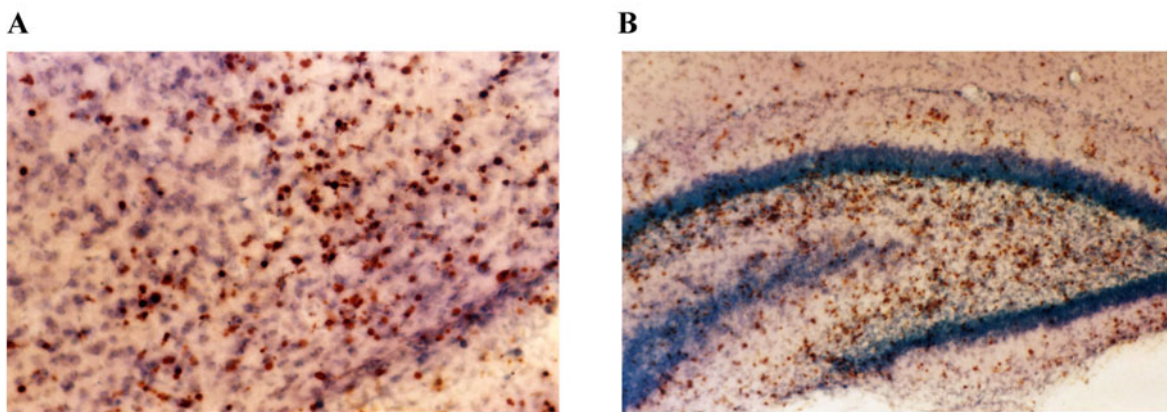


Abbildung 4: *Detailaufnahme aus dem Thalamus und Gyrus dentatus acht Tage alter Ratten 24 Stunden nach Behandlung mit Cyclophosphamid 600 mg/kg KG (A-B):* Placebo (Natriumchlorid) oder Cyclophosphamid 600 mg/kg KG (zum Zeitpunkt 0) wurden Ratten am siebten Lebenstag intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden am achten Lebenstag getötet und perfundiert. Beide Schnitte wurden nach TUNEL gefärbt. Das Gehirn der mit Cyclophosphamid behandelten Ratte zeigt deutlich dunkle (degenerierte) Zellen im Bereich des Thalamus (A) und Gyrus dentatus (B). Die TUNEL-Färbung und die Kupfersilberfärbung nach De Olmos färben die gleichen Populationen degenerierter Zellen an. Zu beachten ist der pyknotische Aspekt der degenerierten Zellen. Vergrößerungsfaktor x100.

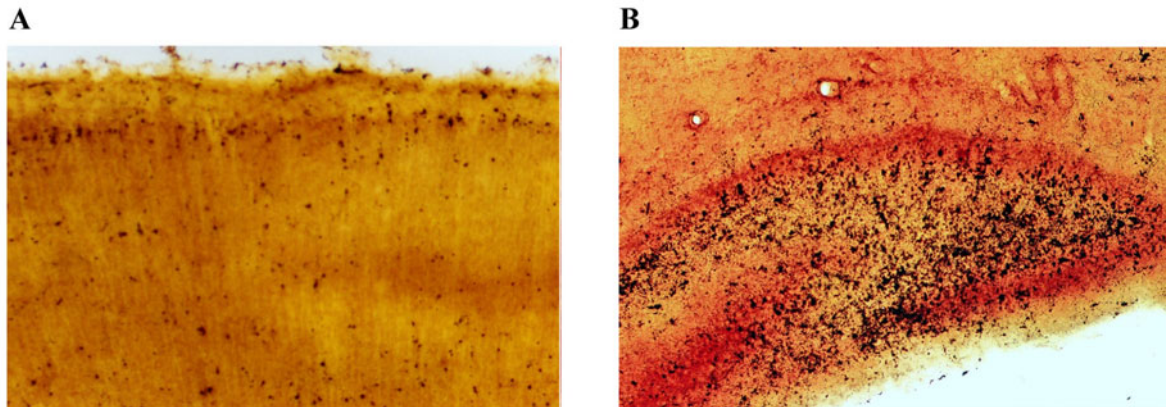


Abbildung 5: Detailaufnahme aus dem Cortex und Gyrus dentatus acht Tage alter Ratten 24 Stunden nach Behandlung mit Thiotepa 45 mg/kg KG: Thiotepa 45 mg/kg KG (zum Zeitpunkt 0) wurde Ratten am siebten Lebenstag intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden am achten Lebenstag getötet und perfundiert. Die histologischen Schnitte wurden nach De Olmos gefärbt. Die dunkel angefärbten Punkte zeigen degenerierte Zellen. Die Gehirne der mit Thiotepa behandelten Ratten (A und B) zeigen deutlich die degenerierte Zellen im Bereich der Laminae II und IV des Cortex frontalis (A) und der Körnerzellen des Gyrus dentatus (B). Vergrößerungsfaktor x 100.

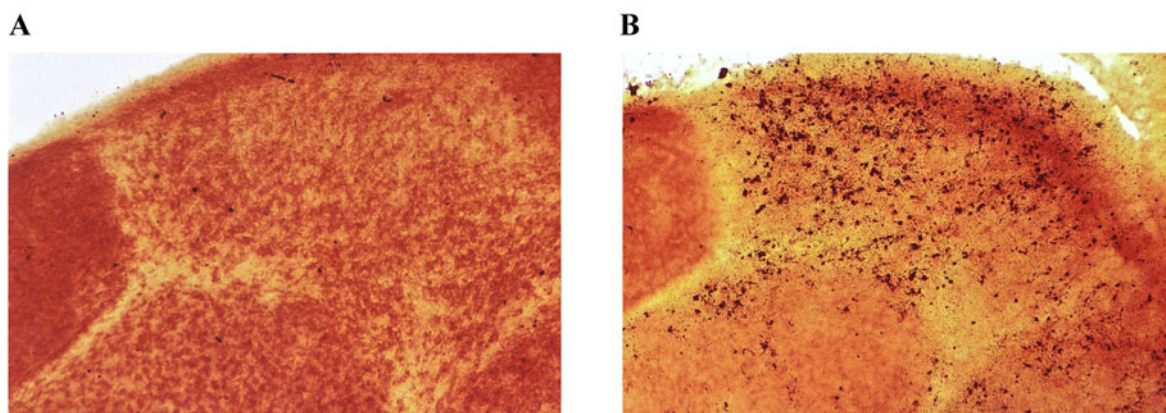


Abbildung 6: Detailaufnahme aus den thalamischen Kerngebieten acht Tage alter Ratten 24 Stunden nach Behandlung mit Plazebo (A) oder Thiotepa 45 mg/kg KG (B): Plazebo (Natriumchlorid) oder Thiotepa 45 mg/kg KG (zum Zeitpunkt 0) wurden Ratten am siebten Lebenstag intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden am achten Lebenstag getötet und perfundiert. Die histologischen Schnitte wurden nach De Olmos gefärbt. Die dunkel angefärbten Punkte zeigen degenerierte Zellen. In den mit Plazebo behandelten Tieren (A) ist die Zahl degenerierter Zellen im Thalamus sehr gering und zum Teil fast gar nicht nachweisbar. Das Gehirn der mit Thiotepa behandelten Ratten (B) zeigt dagegen deutlich mehr dunkle (degenerierte) Zellen im Bereich des Thalamus. Vergleich zum gleichaltrigen, mit Natriumchlorid behandelten Tier (A). Vergrößerungsfaktor x 100.

3.2 Quantifizierung der Zelldeneration nach Gabe von Cyclophosphamid und Thiotepa im infantilen Rattengehirn

Mit Hilfe des stereologischen Dissektors ließ sich die Dichte degenerierender Nervenzellen in den verschiedenen Hirnregionen ermitteln. In den Gehirnen acht Tage alter Ratten, die Kochsalz erhielten, betrug die Dichte der physiologisch degenerierten Zellen in den verschiedenen Hirnregionen zwischen 343 ± 8 und 3401 ± 40 Zellen/mm³ (siehe Tabelle 2).

Die Neuronendichte in den untersuchten Hirnregionen variierte zwischen $133\,945 \pm 13\,148$ und $284\,127 \pm 23\,089$ Zellen/mm³. Somit ließ sich die spontane Apoptoserate im Gehirn acht Tage alter Ratten auf 0,2 bis 1,55% der gesamten Neuronendichte errechnen (Tabelle 2). In den Gehirnen der mit Cyclophosphamid behandelten Ratten war eine starke Zunahme degenerierender Nervenzellen deutlich, deren Ausmaß von einem Faktor 3 in der Lamina 2 des retrosplenialen Kortex bis zu einem Faktor 23 im laterodorsalen Thalamus variiert (Tabelle 2). In den Gehirnen der mit Cyclophosphamid behandelten Ratten degenerierten bis zu 13% der Neurone im parietalen, 11% im frontalen Cortex (Lamina II), 14% der Neurone im Gyrus cinguli (Lamina II), sowie 12% der Neurone im medialen, 11% im laterodorsalen und 10% im ventralen Thalamus und 8% im Gyrus dentatus 24 Stunden nach Injektion der ersten Dosis des Zytostatikums (Tabelle 2).

Tabelle 2: Das Zytostatikum Cyclophosphamid erhöht den Zelluntergang im Gehirn acht Tage alter Ratten. Am siebten Lebenstag erhielten Ratten entweder Plazebo (Natriumchlorid) oder Cyclophosphamid 600 mg/kg KG intraperitoneal. 24 Stunden nach der ersten Injektion, am postnatalen Tag acht, wurden die Ratten getötet. Mit der stereologischen Dissektionsmethode wurden an nach Nissl gefärbten Hirnschnitten die numerischen Dichten von Neuronen in 14 Hirnregionen bestimmt (Zellen/mm³, n=5, Spalte 1). In den nach der De Olmos Methode gefärbten Hirnschnitten wurden dann die numerischen Dichten degenerierter Zellen (Zellen/mm³) in diesen 14 Hirnregionen von mit Cyclophosphamid (n=4) und Plazebo behandelten Ratten (n=5) ermittelt. Das Ausmaß der Apoptose wird als Quotient der numerischen Dichte degenerierender Zellen zur Gesamtzelldichte ermittelt und in Prozent ausgedrückt (Mittelwert ± SEM). Die statistischen Vergleiche zwischen der Plazebo und der Cyclophosphamid Gruppe erfolgten mittels Student's t-Test: *= P < 0,5 und **= P < 0,01

| Hirnregion: | Natriumchlorid | | Cyclophosphamid |
|-------------------------------------|--|--|--|
| | totale Zelldichte (Mittelwert/mm ³)/ SEM | degenerierte Zellen in % der Gesamtzelldichte (Mittelwert/SEM) | degenerierte Zellen in % der Gesamtzelldichte (Mittelwert/SEM) |
| Gyrus dentatus | 284 127 / 23 089 | 0,37 / 0,06 | 2,45 / 0,23 ** |
| Nucleus caudatus | 242 534 / 11 140 | 0,29 / 0,04 | 0,23 / 0,04 |
| Thalamus laterodorsalis | 133 945 / 13 148 | 0,30 / 0,05 | 6,92 / 0,60 ** |
| Thalamus medialis | 199 335 / 6 398 | 0,40 / 0,01 | 4,89 / 0,34 ** |
| Thalamus ventralis | 132 907 / 2 634 | 0,76 / 0,05 | 6,18 / 0,53 ** |
| Hypothalamus ventromedialis | 134 500 / 2343 | 0,90 / 0,01 | 1,06 / 0,08 ** |
| Cortex frontalis, Lamina 2 | 219 432 / 4 541 | 1,55 / 0,18 | 3,91 / 0,43 ** |
| Cortex frontalis, Lamina 4 | 142 120 / 10 323 | 0,20 / 0,05 | 1,45 / 0,15 ** |
| Cortex parietalis, Lamina 2 | 223 900 / 13 434 | 1,08 / 0,28 | 4,86 / 0,32 ** |
| Cortex parietalis, Lamina 4 | 156 078 / 6 323 | 0,22 / 0,05 | 1,18 / 0,05 ** |
| Gyrus cinguli, Lamina 2 | 218 932 / 11 239 | 1,54 / 0,21 | 5,16 / 0,54 ** |
| Gyrus cinguli, Lamina 4 | 148 100 / 6 125 | 0,13 / 0,03 | 1,30 / 0,21 ** |
| Cortex retrosplenialis, Lamina 2 | 235 948 / 13 857 | 0,89 / 0,07 | 2,90 / 0,08 ** |
| Cortex retrosplenialis, Lamina 4 | 143 250 / 10 857 | 0,33 / 0,08 | 1,39 / 0,08 ** |

In den Gehirnen der mit Thiotepa behandelten Ratten war ebenfalls eine Zunahme degenerierter Nervenzellen nachweisbar, deren Ausmaß von einem Faktor 3 im medialen Thalamus bis zu einem Faktor 17 im Gyrus dentatus variierte (Tabelle 3). In den mit Thiotepa behandelten Ratten degenerierten 40% der Neurone im Gyrus dentatus, 6% im Cortex frontalis (Lamina II), im

Cortex parietalis (Lamina II) und im Gyrus cinguli (Lamina II), sowie 6% im medialen und jeweils 5% im laterodorsalen und ventralen Thalamus 24 Stunden nach Injektion der ersten Dosis des Zytostatikums (Tabelle 3).

Tabelle 3: Das Zytostatikum Thiotepe erhöht den Zelluntergang im Gehirn acht Tage alter Ratten. Am siebten Lebenstag erhielten Ratten entweder Plazebo (Natriumchlorid) oder Thiotepe 45 mg/kg KG intraperitoneal. 24 Stunden nach der ersten Injektion, am postnatalen Tag acht, wurden die Ratten getötet. Mit der stereologischen Dissektionsmethode wurden an nach Nissl gefärbten Hirnschnitten die numerische Dichte von Neuronen in 14 Hirnregionen bestimmt (Zellen/mm³, n=5, Spalte 1). In den nach der De Olmos Methode gefärbten Hirnschnitten wurden dann die numerischen Dichten degenerierter Zellen (Zellen/mm³) in diesen 14 Hirnregionen von mit Thiotepe (n=4) und Plazebo behandelten Ratten (n=5) ermittelt. Das Ausmaß der Apoptose wird als Quotient der numerischen Dichte degenerierender Zellen zur Gesamtzelldichte ermittelt und in Prozent ausgedrückt (Mittelwert ± SEM). Die statistischen Vergleiche zwischen der Plazebo und der Thiotepe Gruppe erfolgten mittels Student's t-Test: *= P < 0,5 und **= P < 0,01

| Hirnregion: | Natriumchlorid | | Thiotepe |
|-------------------------------------|--|--|--|
| | totale Zelldichte (Mittelwert/mm ³)/ SEM | degenerierte Zellen in % der Gesamtzelldichte (Mittelwert/SEM) | degenerierte Zellen in % der Gesamtzelldichte (Mittelwert/SEM) |
| Gyrus dentatus | 284 127 / 23 089 | 0,37 / 0,06 | 6,45 / 0,77 ** |
| Nucleus caudatus | 242 534 / 11 140 | 0,29 / 0,04 | 0,50 / 0,11 |
| Thalamus laterodorsalis | 133 945 / 13 148 | 0,30 / 0,05 | 1,54 / 0,52 * |
| Thalamus medialis | 199 335 / 6 398 | 0,40 / 0,01 | 1,26 / 0,44 * |
| Thalamus ventralis | 132 907 / 2 634 | 0,76 / 0,05 | 1,63 / 0,45 * |
| Hypothalamus ventromedialis | 134 500 / 2 343 | 0,90 / 0,01 | 1,16 / 0,31 |
| Cortex frontalis, Lamina 2 | 219 432 / 4 541 | 1,55 / 0,18 | 1,17 / 0,18 |
| Cortex frontalis, Lamina 4 | 142 120 / 10 323 | 0,20 / 0,05 | 1,20 / 0,28 * |
| Cortex parietalis, Lamina 2 | 223 900 / 13 434 | 1,08 / 0,28 | 1,33 / 0,16 |
| Cortex parietalis, Lamina 4 | 156 078 / 6 323 | 0,22 / 0,05 | 1,00 / 0,15 ** |
| Gyrus cinguli, Lamina 2 | 218 932 / 11 239 | 1,54 / 0,21 | 1,20 / 0,17 |
| Gyrus cinguli, Lamina 4 | 148 100 / 6 125 | 0,13 / 0,03 | 1,10 / 0,09 ** |
| Cortex retrosplenialis, Lamina 2 | 235 948 / 13 857 | 0,89 / 0,07 | 0,84 / 0,08 |
| Cortex retrosplenialis, Lamina 4 | 143 250 / 10 857 | 0,33 / 0,08 | 1,49 / 0,35 * |

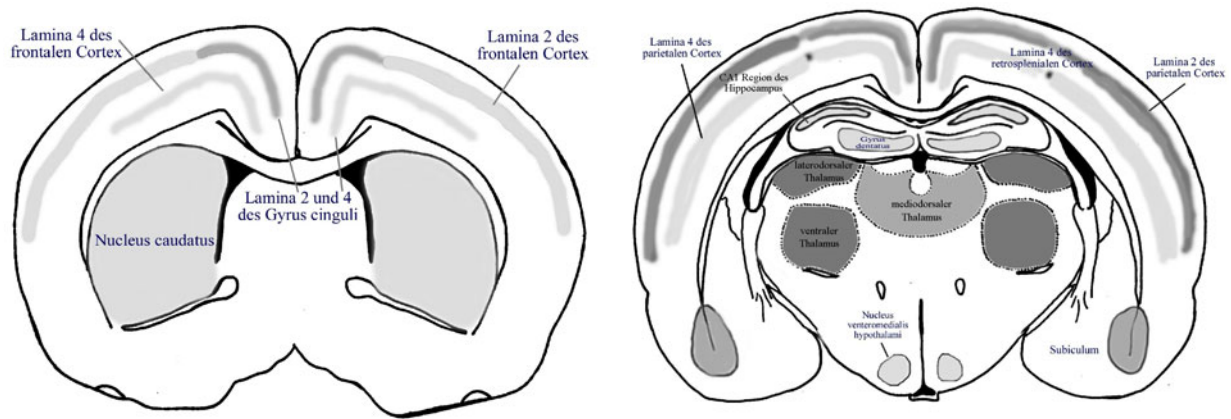


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Verteilung der Neurodegeneration nach Cyclophosphamid im Gehirn 8 Tage alter Ratten: Sieben Tage alte Ratten erhielten entweder Plazebo (Natriumchlorid) oder Cyclophosphamid (600 mg/kg KG intraperitoneal). Nach 24 Stunden, am postnatalen Tag acht, wurden die Tiere getötet. Mit der stereologischen Dissektionsmethode wurden an nach De Olmos bzw. TUNEL gefärbten Hirnschnitten die Dichten degenerierender Zellen in 14 Hirnregionen ermittelt (Siehe Tabelle 2) und in zwei repräsentativen schematischen Hirnschnitten eingezeichnet: Hellgrau = < 4% degenerierende Zellen; grau = 4-6% degenerierende Zellen; dunkelgrau = > 6% degenerierende Zellen. Der rostrale Schnitt (A) zeigt die Verteilung degenerierender Zellen im Cortex frontalis (Lamina 2 und 4) und Nucleus caudatus. Der caudale Schnitt (B) auf Höhe der hinteren Thalamuskern zeigt die Schädigung im Bereich des Cortex parietalis (Lamina 2 und 4), im Feld CA1 und im Gyrus dentatus des Hippocampus, im mediodorsalen, laterodorsalen und ventralen Thalamus sowie Nucleus ventromedialis hypothalami.

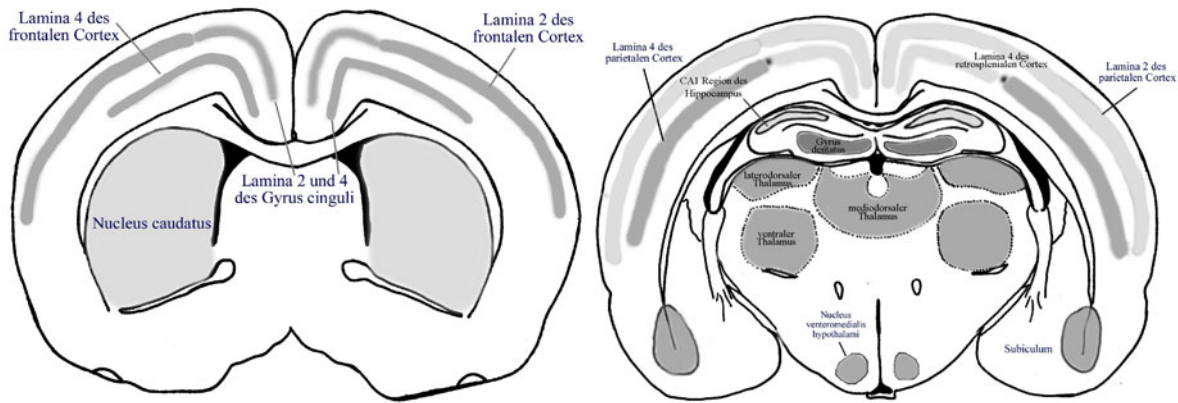


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Verteilung der Neurodegeneration nach Thiotepa im Gehirn 8 Tage alter Ratten: Sieben Tage alte Ratten erhielten entweder Plazebo (Natriumchlorid) oder Thiotepa (45 mg/kg KG intraperitoneal). Nach 24 Stunden, am postnatalen Tag acht, wurden die Tiere getötet. Mit der stereologischen Dissektionsmethode wurden an nach De Olmos bzw. TUNEL gefärbten Hirnschnitten die Dichten degenerierender Zellen in 15 Hirnregionen ermittelt (Siehe Tabelle 3) und in zwei repräsentativen schematischen Hirnschnitten eingezeichnet: Hellgrau = < 1% degenerierende Zellen; grau = 1-6% degenerierende Zellen; dunkelgrau = > 6% degenerierende Zellen. Der rostrale Schnitt (A) zeigt die Verteilung degenerierender Zellen im Cortex frontalis (Lamina 2 und 4) und Nucleus caudatus. Der caudale Schnitt (B) auf Höhe der hinteren Thalamuskern zeigt die Schädigung im Bereich des Cortex parietalis (Lamina 2 und 4), im Feld CA1 und im Gyrus dentatus des Hippocampus, im mediodorsalen, laterodorsalen und ventralen Thalamus sowie Nucleus ventromedialis hypothalami.

3.3 Die ultrastrukturellen Merkmale der Zelldegeneration nach Cyclophosphamid

Die positive TUNEL-Färbung deutet auf einen möglichen apoptotischen Pathomechanismus hin. Da aber auch degenerierte Zellen, die nicht über einen apoptotischen Zelltodmechanismus sterben, durch die TUNEL-Färbung angefärbt werden können, wurde eine elektronenmikroskopische Untersuchung angeschlossen, um verlässlichere Aussagen über die Natur des Zelltodes zu treffen. Die elektronenmikroskopische Untersuchung degenerierender Zellen erfolgte an Ultradünnschnitten aus dem Cortex parietalis und dem Thalamus.

In Abbildung 9 ist ein angeschwollener Dendrit mit einem geschwollenen Mitochondrium 4h nach der Applikation von Cyclophosphamid zu sehen. Diese Veränderungen deuten auf einen exzitotoxischen Zelltodmechanismus hin.

In Abbildung 10 und 11 sind typische ultrastrukturelle Veränderungen der späten Apoptose zu erkennen. In der frühen Phase des apoptotischen Zelluntergangs verdichtet sich das Nukleoplasma flockig und bildet Chromatinklumpen. Die Kernmembran ist zu diesem frühen Zeitpunkt noch intakt. Das Zytoplasma beginnt zu kondensieren, die Mitochondrien sind noch intakt, es gibt keine Veränderungen am endoplasmatischen Retikulum und den Ribosomen. Im weiteren

Verlauf entstehen Risse in der Kernmembran und es kommt zu einer Vermischung von Nukleoplasma und Cytoplasma. Das Nukleoplasma verdichtet sich zu runden elektronendichten Massen, die durch das Zytoplasma hindurch zum Rand der Zelle wandern (Abb. 10). Die Mitochondrien beginnen anzuschwellen, die Zelle zieht sich im Ganzen zusammen. Die Zellmembran bildet später Ausstülpungen, aus denen die so genannten apoptotischen Körperchen entstehen. Diese Abfolge und Art der Veränderungen findet man in Neuronen im infantilen Gehirn während der physiologischerweise ablaufenden Apoptose.

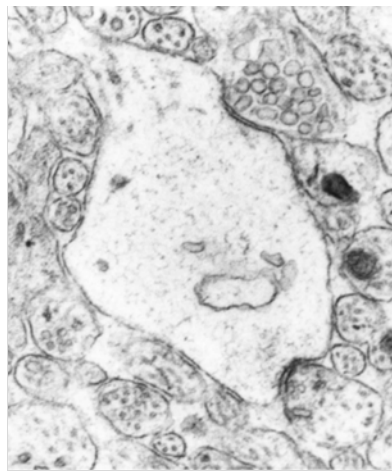


Abbildung 9: *Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dendriten in einem frühen Stadium des durch Cyclophosphamid hervorgerufenen Zelltodes:* Der abgebildete Dendrit stammt aus dem Cortex parietalis einer mit Cyclophosphamid (400 mg/kg intraperitoneal) behandelten sieben Tage alten Ratte 4 Stunden nach der Injektion. Der Dendrit beinhaltet ein geschwollenes Mitochondrium. Der Dendrit zeigt zwei synaptische Verdichtungen, des weiteren ist eine präsynaptische Endigung mit synaptischen Vesikeln zu sehen. Vergrößerungsfaktor x 9,000.

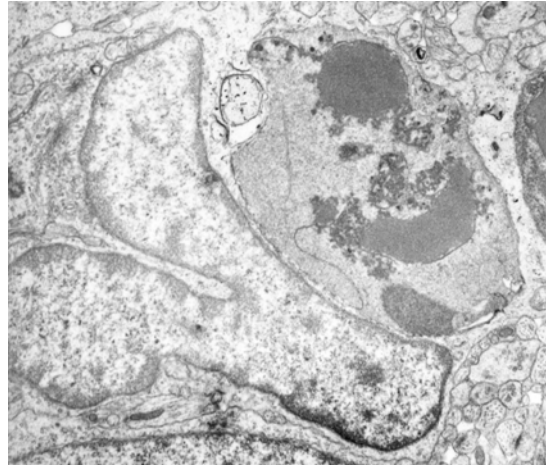


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle, die nach Gabe von Cyclophosphamid Zeichen aktiven Zelltodes zeigt: Die abgebildete Zelle stammt aus dem Thalamus einer mit Cyclophosphamid (400 mg/kg) behandelten acht Tage alten Ratte. Man erkennt noch intakte Zellmembran. Das Nukleoplasma hat sich zu einer runden elektronendichten Masse verdichtet, die durch das Zytoplasma hindurch zum Rand der Zelle gewandert ist. Das Zytoplasma ist dunkel, die Zelle liegt einer Gliazelle an, die im Begriff ist diese aufzunehmen. Vergrößerungsfaktor x 7,000.

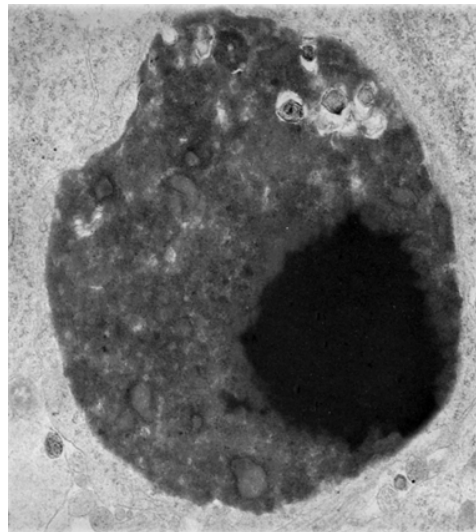


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle in einem späten Stadium des durch Cyclophosphamid hervorgerufenen aktiven Zelltodes: Die abgebildete Zelle stammt aus dem laterodorsalen Thalamus einer mit Cyclophosphamid (400 mg/kg) behandelten acht Tage alten Ratte 12h nach Injektion. Das Cytoplasma der Zelle ist dunkel gefärbt, eine Kernmembran ist nicht mehr zu erkennen, das Chromatin hat sich zu einer elektronendichten Masse verdichtet und ist bereits in die Peripherie gewandert. Vergrößerungsfaktor x 9,000.

3.4 Immunhistochemie für Caspase 3 und den Fas Rezeptor

Die Immunhistochemie zeigte eine starke Aktivierung von Caspase 3 und eine erhöhte Expression des Fas Rezeptors in Abschnitten der Gehirne in denen die Neurotoxizität der Zytostatika nachweisbar war.

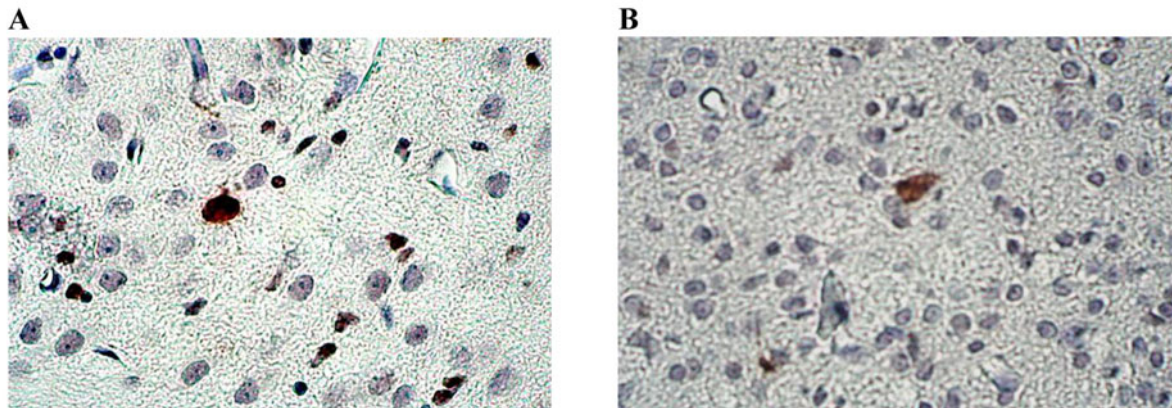


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von aktivierter Caspase 3 und Expression des Fas Rezeptors: 7 Tage alte Ratten erhielten eine Einzeldosis Cyclophosphamid (600 mg/kg KG intraperitoneal) und wurden nach 16 Stunden getötet (n=4). In den lichtmikroskopischen Bildern zeigt sich eine Aktivierung der Caspase 3 (A) sowie eine erhöhte Expression des Fas Rezeptors (B) auf thalamischen Neuronen. Die immunpositiven Zellen für aktivierte Caspase und den Fas Rezeptor sind braun angefärbt. Vergrößerungsfaktor x 400 in A und x 200 in B.

3.5 Dosisabhängigkeit der Schädigung durch Cyclophosphamid und Thiotepa

In den Gehirnen sieben Tage alter Ratten zeigte sich eine dosisabhängige Neurotoxizität nach Zytostatikagabe. Untersucht wurde die Dosisabhängigkeit von Cyclophosphamid und Thiotepa nach einmaliger Gabe in einem Dosisbereich von 200 bis 600 mg/kg KG für Cyclophosphamid und 15 bis 45 mg/kg KG für Thiotepa. Die Zytostatika wurden sieben Tage alten Ratten intraperitoneal injiziert und die Tiere wurden 24 Stunden später getötet und perfundiert. Das Ausmaß der Zelldegeneration wurde mit Hilfe des stereologischen Dissektors ermittelt. Es fand sich eine signifikante Neurotoxizität ab einer Einzeldosis von 400 mg/kg Cyclophosphamid und 15 mg/kg Thiotepa.

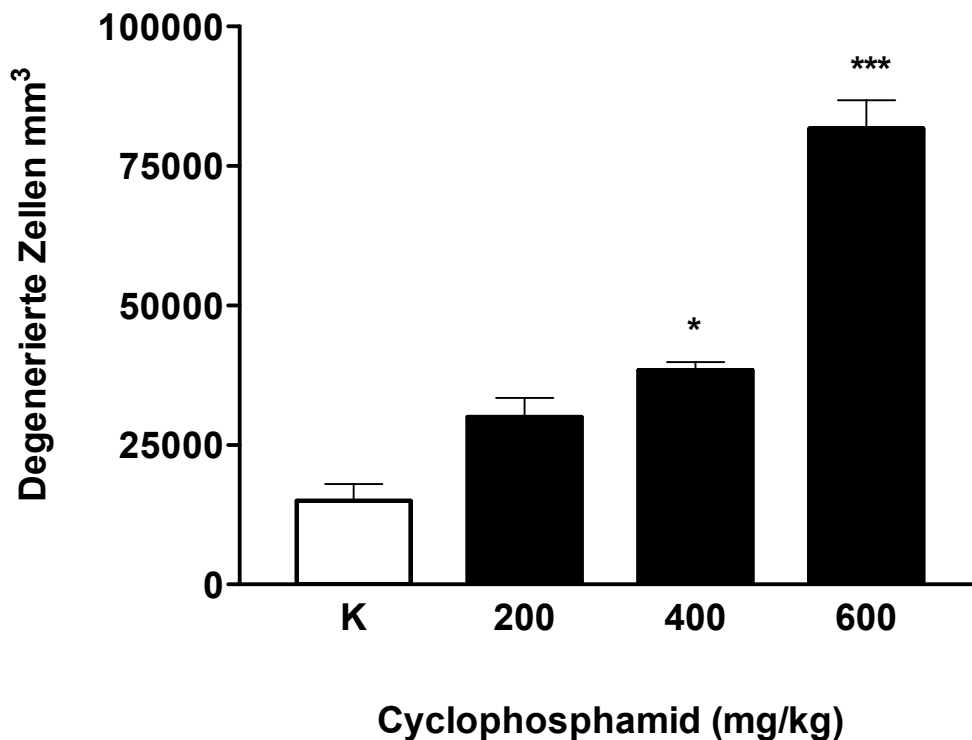


Abbildung 13: Dosis- Wirkungsbeziehung der Neurotoxizität von Cyclophosphamid: Sieben Tage alte Ratten erhielten eine Einzeldosis Cyclophosphamid (200, 400, und 600 mg/kg KG intraperitoneal) und wurden nach 24 Stunden getötet (n=5/Gruppe). In den nach De Olmos gefärbten Hirnschnitten wurde mit der stereologischen Dissektionsmethode die Dichten degenerierender Zellen (Zellen pro Kubikmillimeter) pro Gruppe in 14 Hirnregionen (siehe Tabelle 2) bestimmt. Diese Zelldichten wurden für jedes Gehirn addiert (Score). Die Säulen zeigen die Mittelwerte der ermittelten Scores \pm SEM (n= 5/Gruppe) nach Gabe von Cyclophosphamid oder Placebo (K). Varianzanalyse (ANOVA) der auf diese Weise ermittelten Scores ergab einen signifikanten Effekt der Behandlung mit Cyclophosphamid auf das Ausmaß der Neurodegeneration im Gehirn [$p < 0,0001$].

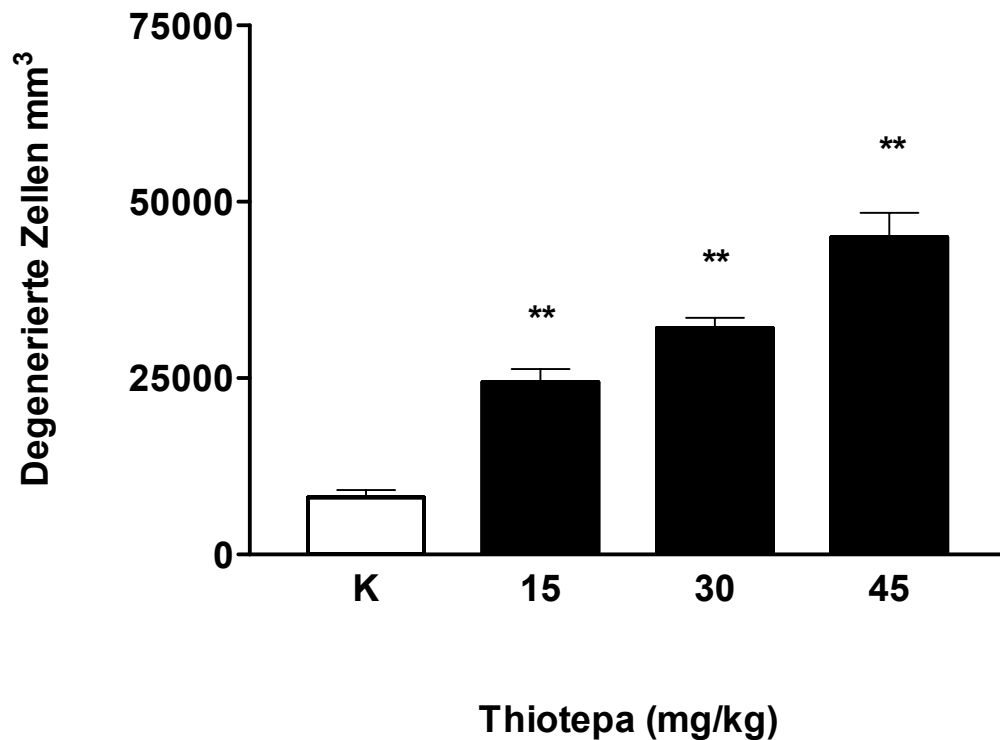


Abbildung 14: Dosis- Wirkungsbeziehung der Neurotoxizität von Thiotepa: Sieben Tage alte Ratten erhielten eine Einzeldosis Thiotepa (15, 30, und 45 mg/kg KG intraperitoneal) und wurden nach 24 Stunden getötet (n=4/Gruppe). In den nach De Olmos gefärbten Hirnschnitten wurde mit der stereologischen Dissektionsmethode die Dichten degenerierender Zellen (Zellen pro Kubikmillimeter) in 14 Hirnregionen (siehe Tabelle 3) bestimmt. Diese Zelldichten wurden für jedes Gehirn addiert (Score). Die Säulen zeigen die Mittelwerte der ermittelten Scores \pm SEM (n=4/Gruppe) nach Gabe von Thiotepa oder Placebo (K). Varianzanalyse (ANOVA) der auf diese Weise ermittelten Scores ergab einen signifikanten Effekt der Behandlung mit Thiotepa auf das Ausmaß der Neurodegeneration im Gehirn [$p < 0,0001$].

3.6 Altersabhängigkeit der Schädigung durch Cyclophosphamid

Zur Untersuchung der altersabhängigen Schädigung durch Zytostatika wurde 7-28 Tage alten Ratten Cyclophosphamid in der höchsten verträglichen Dosis von 600 mg/kg KG intraperitoneal injiziert und die Ratten nach 24 Stunden getötet. Die Gehirne wurden nach De Olmos gefärbt. Das höchste Ausmaß an Zelldegeneration fand sich in der Gruppe der 7 Tage alten Tiere (Abb. 15) in vielen verschiedenen Gehirnregionen. Bei den 14-28 Tage alten Tieren hingegen war die Zelldegeneration primär im Cortex zu beobachten, begleitet von Mikrohämmorrhagien.

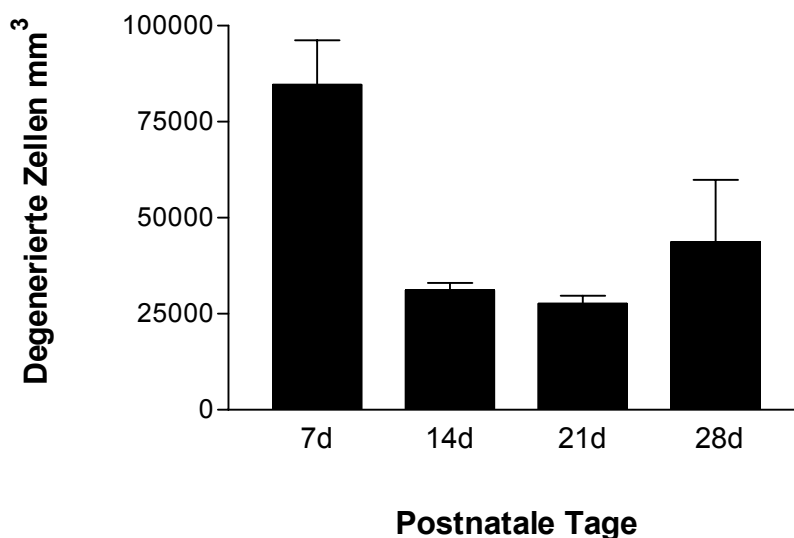


Abbildung 15: Altersabhängigkeit der Neurotoxizität von Cyclophosphamid: 7, 14, 21 und 28 Tage alte Ratten erhielten eine Einzeldosis Cyclophosphamid (600 mg/kg KG intraperitoneal) und wurden nach 24 Stunden getötet (n=4-6 pro Altersgruppe). In nach De Olmos gefärbten Hirnschnitten wurden mit der stereologischen Dissektionsmethode die Dichten degenerierender Zellen (Zellen/mm³) in 14 Hirnregionen bestimmt. Diese Zelldichtewerte wurden zu einem Gesamtwert für jedes Gehirn addiert (Score). Varianzanalyse (ANOVA) der auf diese Weise ermittelten Scores ergab einen signifikanten Effekt der Behandlung mit Cyclophosphamid auf das Ausmaß der Neurodegeneration im Gehirn [$p < 0,0001$]. Um zu überprüfen, zwischen welchen Gruppen die Unterschiede liegen, die diesen signifikanten Haupteffekt verursacht haben, wurden Scheffé-Tests als Einzelvergleiche gerechnet. Dabei ergab sich, dass sich die Gruppe der 7 Tage alten Ratten signifikant von allen anderen Gruppen unterscheidet, während zwischen diesen keine Unterschiede bestehen.

4. Diskussion

4.1 Allgemeine Betrachtung

Maligne Tumoren und hämatologische Systemerkrankungen im Kindesalter sprechen auf eine Behandlung mit Zytostatika in der Regel gut an. Solide Tumoren werden heute aufgrund ihrer frühen Metastasierung auch als systemische Erkrankungen aufgefasst. Aus diesem Grund steht die zytostatische Therapie im Mittelpunkt der Behandlungsstrategie.

Neue Therapieverfahren, wie etwa die Hochdosischemotherapie führten zu großen Fortschritten in der Behandlung dieser Tumoren [MacDonald, et al., 2003; Rubnitz und Pui, 2003]. Durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren und der Entwicklung der Knochenmarkstransplantation wurde die Knochenmarkstoxizität als limitierender Faktor der Chemotherapie überwunden. Heute führen die neurotoxischen Wirkungen der Therapie häufig zu einer Dosisanpassung und Modifikation der Therapie. Neuropsychologische Defizite reduzieren die Lebensqualität der Patienten in erheblichem Maße. Aus diesem Grund stellt die Vermeidung therapieinduzierter unerwünschter neurotoxischer Wirkungen eine große Herausforderung dar.

4.2 Neurotoxizität von Cyclophosphamid und Thiotepa

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die systemische Applikation von Cyclophosphamid und Thiotepa im infantilen Rattengehirn eine massive Neurotoxizität auslösen. Die histologischen Präparate zeigten in der Übersichtsfärbung nach De Olmos ausgeprägte Zelldegenerationen. Die Zelluntergänge konzentrierten sich auf den Hippocampus und die thalamischen Kerngebiete. Die immunhistochemischen und ultrastrukturellen Veränderungen ließen erkennen, dass sowohl ein exzitotoxischer als auch ein Caspase-vermittelter Zelltodmechanismus daran beteiligt ist.

4.2.1 Exzitotoxizität

Die positive TUNEL-Färbung deutet auf einen aktiven apoptotischen Pathomechanismus hin, erlaubt jedoch keine spezifische Differenzierung des Zelltodmechanismus. Aus diesem Grund wurde die elektronenmikroskopische Untersuchung angeschlossen. Ultrastrukturell ließen sich bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach der Applikation der Zytostatika anschwellende Dendriten nachweisen. Die präsynaptischen Axonendigungen blieben erhalten. Diese ultrastrukturellen

Veränderungen weisen auf einen exzitotoxischen Zelltodmechanismus hin, wie sie von Olney in Versuchen zum durch Glutamat getriggerten neuronalen Zelltod erstmals beschrieben wurden [Olney, et al., 1971]. Allerdings konnten in den durchgeführten Versuchen keine Neurone identifiziert werden, die ein geschwollenes Zytoplasma oder angeschwollene Mitochondrien zeigen, beides Phänomene, die im Rahmen von klassischen exzitotoxischen Läsionen im infantilen Rattengehirn beschrieben wurden. Solche Veränderungen wurden zu einem frühen Zeitpunkt, d.h. einige Stunden, nach der Gabe von exzitotoxischen Aminosäuren, einer hypoxischen Ischämie oder einem Trauma beobachtet [Ikonomidou, et al., 1989; Ikonomidou, et al., 1989; Ikonomidou, et al., 1996; Olney, et al., 1971].

4.2.2 Caspase-vermittelter Zelltod (Apoptose)

In Übereinstimmung mit den Arbeiten von Ishimaru und Dikranian zeigte sich, dass nach längeren Überlebenszeiten der Tiere sich weitere ultrastrukturelle Veränderungen fanden, die auf einen apoptotischen Zelltodmechanismus hindeuten [Dikranian, et al., 2001; Ishimaru, et al., 1999]. Hierzu zählt die Verdichtung des Nukleoplasmas als auch die Kondensation des Zytoplasmas bei noch intakten Zellorganellen. Im weiteren Verlauf kam es zu Rissen in der Kernmembran, einer Vermischung von Nukleoplasma und Zytoplasma sowie zur Bildung von so genannten apoptotischen Körperchen.

Die durchgeführte immunhistochemische Untersuchung für aktivierte Caspase 3 zeigte eine deutlich positive Färbung. Dies deutet ebenfalls auf das Vorhandensein apoptotischer Zelltodvorgänge nach Applikation der Zytostatika hin.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass der neuronale Zelltodprozess nach der systemischen Gabe der Zytostatika sowohl aus einer frühen exzitotoxischen als auch einer späten aktiven (apoptotischen) Komponente besteht.

In der Literatur liegen verschiedene Studien zur Neurotoxizität von Zytostatika vor. Die *in vitro* Untersuchungen haben sich insbesondere mit der Neurotoxizität des Cisplatin und der Vinca Alkaloide im sympathischen Nervensystem und in Motoneuronen beschäftigt, um die Frage der häufig beobachteten peripheren Neuropathien als Folge der zytostatischen Therapie zu untersuchen [Goźdz, et al., 2003; Macdonald, 1991; Park, et al., 1998; Park, et al., 1998]. Zur Neurotoxizität im ZNS liegen Untersuchungen für Methotrexat vor. Diese Untersuchungen wurden an den Kleinhirnen von Meerschweinchen durchgeführt. Die Degeneration von

Purkinjezellen, die durch den Schwund und die Verzerrung der Perikarien sichtbar wurden, sind beschrieben [el-Badawi, et al., 1990].

Die Mechanismen der Zellschädigung, die für die Exzitotoxizität verantwortlich sein können, sind möglicherweise mit einer Störung im mitochondrialen Energiestoffwechsel verbunden. Diese Störungen führen zum oxidativen Stress und einer erhöhten Vulnerabilität der Neurone gegenüber physiologischen Glutamatkonzentrationen [Murphy, et al., 1999; Souid, et al., 2003]. Es konnte gezeigt werden, dass DNA Schäden zu einer Mobilisation der poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) führt, welche die Ribosylierung von Zielproteinen für die aktive DNA Reparatur aktiviert [Ha und Snyder, 2000; Zhou und Elledge, 2000]. Das Substrat von PARP ist ein höchst energetisches Molekül (NAD⁺). Die Aktivierung von PARP vermindert möglicherweise die zellulären Energievorräte, was zu einer neuronalen Membrandepolarisation mit einer erweiterten Signalgebung durch den N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor (NMDAR) und schließlich zum exzitotoxischen Zelltod führt [Ha und Snyder, 2000]. Zusätzlich führt die Unterbrechung des energieabhängigen Glutamat-Aufnahmesystems zu einer erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentration und zum Anstoß einer langsamen exzitotoxischen Kaskade.

Andere Untersuchungen zeigen, dass die meisten Zytostatika durch die Aktivierung von Caspasen den Tumorzelltod induzieren [Kim, et al., 2002; Solary, et al., 2000]. Untersuchungen der molekularen Mechanismen, die zur Apoptose in Tumorzellen führen, haben gezeigt, dass Zytostatika verschiedene Wege aktivieren, die den aktiven Zelltodprozess regulieren. Ein Hauptweg wird durch die Ausschüttung von Molekülen aus dem intermembranösen Spalt der Mitochondrien in das Zytosol getriggert. Dies geschieht unter der Kontrolle von Bcl-2 und Bcl-2-verwandter Proteine und wahrscheinlich unter der Kontrolle von Bax, welches die Formationsänderung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran zur Folge hat. Zu diesen Molekülen gehört auch das Cytochrom-c, welches durch den Eintritt in das Zytosol die Oligomerisation von APAF-1 (apoptotic protease aktivierender Faktor 1) durch ATP induziert [Hu, et al., 1999; Li, et al., 1997]. Dies führt zur Aktivierung von Caspase 9 und den absteigenden Caspasen. Ein anderer gut beschriebener Weg, der in Tumorzellen zum aktiven Zelltod führt, ist Fas abhängig. Fas und der Fas- Rezeptor werden auf verschiedensten Geweben exprimiert. Über Fas/FasL kommt es zur Formierung des Death initiating signaling Komplexes (DISC), welcher FADD (fas associated death domain) und die Procaspase 8 einbezieht. Die Oligomerisation der Procaspase 8 in DISC führt zur Aktivierung proteolytischer Enzyme und Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Es konnte gezeigt werden, dass Zytostatika eine Hochregulierung von FasL und dessen

Interaktion mit Fas auf der Oberfläche von Tumorzellen induziert [Friesen, et al., 1996; Fulda, et al., 2000; Muller, et al., 1998].

4.3 Dosisabhängigkeit der neurotoxischen Wirkung der Zytostatika

Neurotoxische Nebenwirkungen im Rahmen einer zytostatischen Therapie führen häufig zu einer Dosisanpassung. Seit die Knochenmarksdepression, einer der limitierenden Faktoren in den meisten Chemotherapieprotokollen, durch die Gabe von Wachstumsfaktoren oder einer Stammzelltransplantation überwunden werden konnte, ist der Einsatz von Hochdosischemotherapien mit einem erhöhten Risiko der Neurotoxizität verbunden [Verstappen, et al., 2003]. Hier handelt es sich insbesondere um die Therapieschemata solider Tumoren, wie zum Beispiel Hirntumoren, Weichteilsarkome und Keimzelltumoren.

In dieser Arbeit zeigt die histologische Untersuchung der Gehirne acht Tage alter Ratten, dass die Zytostatika Cyclophosphamid und Thiotepa eine ausgeprägte, dosisabhängige Neurodegeneration im infantilen Rattengehirn während der Phase des rapiden Hirnwachstums hervorrufen. Für Cyclophosphamid konnte ein signifikanter Anstieg der Zelldegeneration ab einer Dosis von 400 mg/kg KG beobachtet werden. Ab einer Dosierung von 600 mg/kg KG Cyclophosphamid zeigen sich maximale Schädigungen. Besonders betroffen waren die Regionen im Bereich des parietalen, cingulären und retrosplenialen Cortex und dem Gyrus dentatus. Weniger stark betroffen waren die Regionen des Nucleus caudatus und der thalamischen Kerngebiete (s. Abb. 2B, 3B, Tabelle 2).

Für eine signifikante neurotoxische Wirkung nach Applikation von Thiotepa im Gehirn acht Tage alter Ratten war eine einmalige Gabe von 15 mg/kg KG ausreichend, eine maximale Schädigung zeigte sich ab einer Dosierung von 45 mg/kg KG. Auch hier waren insbesondere die Regionen des Gyrus dentatus betroffen (s. Abb. 5B). Zusätzlich fanden sich ausgeprägte zytotoxische Effekt im Bereich des parietalen, cingulären und retrosplenialen Cortex, sowie der thalamischen Kerngebiete (s. Abb. 6B).

Ähnliche Ergebnisse konnten in *in vitro* Versuchen gezeigt werden. Eine signifikante Toxizität zeigte sich 24 h nach der Applikation von 50 μ M Cyclophosphamid und Thiotepa [Rzeski, et al., 2004]. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass beide Substanzen zu einer dosisabhängigen neuronalen Schädigung führen.

4.4 Altersabhängigkeit der neurotoxischen Wirkung

Während der Synaptogenese, auch bekannt als Phase des rapiden Hirnwachstums, sind Neurone sehr anfällig für Störungen in ihrer Umgebung. Während dieser Phase führen abnorme Stimulationen des NMDA-Glutamatrezeptors zum neuronalen exzitotoxischen Zelltod. Andererseits führt eine Blockade des NMDA Rezeptors oder eine Stimulation des GABA_A Rezeptors zu einer apoptotischen Neurodegeneration [Ikonomidou, et al., 1999; Ikonomidou, et al., 2000]. In dieser Entwicklungsphase reicht bereits eine vorübergehende Störung, die nur einige Stunden andauert aus, um entweder eine exzitotoxische oder apoptotische Neurodegeneration zu induzieren.

Neben der bereits beschriebenen Dosisabhängigkeit, zeigen klinische Studien eine altersabhängige Neurotoxizität im Rahmen einer zytostatischen Therapie im Kindesalter [Reddy und Witek, 2003]. Deshalb wurden für die Beurteilung der Vulnerabilität des infantilen Rattengehirns in dieser Studie verschiedene Altersgruppen untersucht. Es zeigte sich, dass die Schwere der neuronalen Schädigung bei den 7 Tage alten Ratten am höchsten war. Bei den untersuchten Ratten nach 14, 21 und 28 Tagen fiel die Schädigung deutlich geringer aus. Es zeigt sich also eine deutlich altersabhängige neuronale Schädigung. Dieser Verlauf korreliert mit der Hirnwachstumsgeschwindigkeit der Ratte wie sie in Abbildung 1 dargestellt ist.

Während bei den jüngeren Tieren viele Gehirnregionen betroffen waren, zeigte sich bei den 14-28 Tage alten Tieren lediglich eine Schädigung im Bereich des Cortex und des Gyrus dentatus. Bei den älteren Tieren ließen sich zusätzlich Mikrohämorrhagien im Bereich des Cortex beobachten.

4.5 Wirkungsverstärkung der Neurotoxizität

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Exzitotoxizität bei der Entstehung neurologischer Komplikationen einer zytostatischen Therapie eine wichtige Rolle spielen kann. Olney wies nach, dass die extrazelluläre Glutamatkonzentration ein wichtiger Triggerfaktor für die Exzitotoxizität darstellt [Olney, 1971]. Tierexperimentelle Untersuchungen von Ikonomidou et al. belegten, dass Zustände wie Sepsis, Trauma, Epilepsie, Hypoxie oder Ischämie exzitotoxische Zelluntergänge verursachen [Ikonomidou, et al., 1989; Ikonomidou, et al., 1989; Ikonomidou, et al., 1996]. Treten mehrere dieser Zustände gleichzeitig auf, summieren sie sich möglicherweise in ihrer neurotoxischen Wirkung. Für die sichere Durchführung einer

zytostatischen Therapie erscheint es als sinnvoll, alle potentiell neurotoxischen Faktoren zu erfassen und nach Möglichkeit zu minimieren.

4.6 Klinische Aspekte

Klinische Studien zeigen, dass in Folge einer Bestrahlung oder zytostatischen Therapie häufig gravierende neuropsychologische Defizite auftreten [Kramer, et al., 1997]. Das Spektrum neurologischer Symptome umfasst Erkrankungen wie die Leukenzephalopathie, Epilepsien, Hirninfarkte, zentrale wie periphere Paresen, Neuropathien und die Ototoxizität [Reddy und Witek, 2003]. Die Vermeidung dieser, die Lebensqualität stark einschränkenden unerwünschten Wirkungen, stellt weiterhin eine große Herausforderung dar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die neurotoxischen Effekte der Zytostatika eine deutliche Dosis- und Altersabhängigkeit aufweisen. Dies ist ein wichtiger Befund im Rahmen der Erforschung der Pathogenese neurologischer Komplikationen einer zytostatischen Therapie.

Die Zellschäden konzentrieren sich in der vorliegenden Untersuchung auf den Hippocampus, den Thalamus und den parietalen Cortex. Die unerwünschten neurologischen Wirkungen der zytostatischen Therapie bei Kindern, lassen sich möglicherweise durch eine Schädigung dieser Gehirnareale erklären.

Prospektiv angelegte klinische Untersuchungen belegen eine deutliche Altersabhängigkeit neurokognitiver Defizite [Kramer, et al., 1997; Robison und Bhatia, 2003]. Bei Leukämiepatienten nach einer Knochenmarkstransplantation zeigte sich eine deutliche, altersabhängige Abnahme des Intelligenzquotienten [Kramer, et al., 1997; Simms, et al., 2002]. Im Vergleich zu älteren Kindern, zeigten sich in der Untersuchung von Robison und Bhatia, dass Kinder unter 6 Jahren, die eine Schädelbestrahlung und oder intrathekale zytostatische Therapie erhielten, signifikant häufiger besondere schulische Unterstützung benötigten [Robison und Bhatia, 2003]. Auch Palmer konnte in einer klinischen Studie an Patienten zeigen, dass nach postoperativer Radiochemotherapie eines Medulloblastom es zu einer Abnahme des Intelligenzquotienten kam [Palmer, et al., 2001].

Auch in der vorliegenden Untersuchung hatte das Alter der Tiere einen starken Einfluss auf das Ausmaß der Zytotoxizität. Die größte Schädigung konnte bei den jüngsten untersuchten Tieren, sieben Tage nach Geburt, beobachtet werden. Mit zunehmendem Alter reduzierte sich die zytotoxische Wirkung. Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung einer an das Alter und die Reife des Kindes adaptierten Therapie.

4.7 Fehlermöglichkeiten

In den durchgeführten Experimenten ließ sich die Neurotoxizität von Cyclophosphamid und Thiotepa für infantile Ratten eindeutig belegen. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf den klinischen Einsatz ist nur eingeschränkt möglich.

Die Zytostatikakonzentrationen in dieser Untersuchung lagen bewusst über den Dosierungen, die in der zytostatischen Therapie eingesetzt werden. Um deutliche neurotoxische Effekte zu erzielen, orientierte sich die Dosierung an der Maximaldosis, welche von den Tieren regelmäßig überlebt wurde. Dieses Setting führt möglicherweise zu einer Überbewertung neurotoxischer Effekte.

Andererseits konnte in dieser Untersuchung weder eine repetitive Gabe der Zytostatika noch eine Kombination verschiedener Zytostatika realisiert werden, wie es in den meisten aktuellen Chemotherapieprotokollen gehandhabt wird.

Auch eine Störung in der Bluthirnschranke kann die Neurotoxizität der Zytostatika stark beeinflussen.

4.8 Ausblick

Die vorliegende Arbeit belegt, dass zwei unterschiedliche Pathomechanismen zur Neurotoxizität der Zytostatika beitragen. Möglicherweise lassen sich auf Grund dieser Erkenntnisse selektive Chemotherapeutika oder Neuroprotektiva entwickeln, um so neurologischen Komplikation der Chemotherapie vorzubeugen.

Interessant wäre auch die Identifikation von spezifischen Parametern, die einen Neuronenuntergang signalisieren und Anlass zu einer Modifikation der zytostatischen Therapie geben können.

5. Zusammenfassung

In Deutschland erkranken jährlich etwa 2000 Kinder an malignen Neoplasien [Kaatsch P, 2002; Tallen, 2003]. Neoplasien stellen die zweithäufigste Todesursache im Kindesalter dar. Die Entwicklung neuer Therapien führte in den letzten Jahrzehnten zu verbesserten Heilungschancen und einer deutlich verlängerten Lebensdauer der Kinder [Graham, et al., 1997; Tallen, 2003; Tallen, 2003]. Neuropsychologische Defizite, die als unerwünschte Wirkungen der Therapie häufig auftreten, stellen weiterhin eine große Herausforderung in der Therapie dieser Erkrankungen dar, da sie die Lebensqualität der Patienten stark beeinträchtigen [Hussain, et al., 1993; Verstappen, et al., 2003]. Die Reduktion dieser unerwünschten Wirkungen ist besonders wichtig, weil die Behandlung eingetretener Komplikationen sich auf symptomatische Maßnahmen beschränkt. Spezifische neuroprotektive Maßnahmen stehen in der klinischen Praxis zurzeit nicht zur Verfügung. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Art und des Umfangs der Neurotoxizität von Cyclophosphamid und Thiotepa.

Es wurden Han Wistar-Ratten im Alter von 7, 14, 21 und 28 Tagen die zu testenden Medikamente oder isotone Kochsalzlösung intraperitoneal (i.p.) injiziert. Nach einer Überlebenszeit von 24 Stunden wurden die Tiere getötet. Die Gehirnschnitte wurden nach De Olmos und TUNEL gefärbt. Zusätzlich wurden elektronmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen vorgenommen.

- Beide Zytostatika zeigten eine ausgeprägte, dosisabhängige neurotoxische Wirkung.
- Für Cyclophosphamid konnte belegt werden, dass die Neurotoxizität ein altersabhängiges Phänomen darstellt, wobei das Ausmaß der Zellschädigung mit zunehmendem Alter abnahm. Die Altersabhängigkeit der Neurotoxizität von Thiotepa wurde nicht untersucht.
- Die Zelluntergänge zeigten ein heterogenes Verteilungsmuster. Besonders ausgeprägte Schädigungen fanden sich im parietalen, frontalen und cingulären Cortex sowie in den thalamischen Kerngebieten und dem Hippocampus.
- Für Cyclophosphamid konnten an Hand ultrastruktureller und immunhistochemischer Kriterien zwei unterschiedliche Zelltodprozesse identifiziert werden. Es konnte ein früher exzitotoxischer Prozess von einem späten apoptotischen Zelluntergang abgegrenzt werden.

Diese Ergebnisse stellen eine Erklärung für das häufige Auftreten neurologischer Nebenwirkungen im Rahmen einer zytostatischen Therapie im Kindesalter dar. Dies betont die Bedeutung einer exakten Therapieplanung im Kindesalter. Die deutliche Altersabhängigkeit der Neurotoxizität legt es nahe, die Therapieprotokolle noch stärker an das Alter der Kinder anzupassen.

Die Toxizität der untersuchten Zytostatika war auf zwei unterschiedliche Pathomechanismen zurückzuführen. Neben der primären exzitotoxischen Schädigung, hatte die Apoptose einen großen Einfluss auf das Ausmaß der Neurotoxizität. Möglicherweise lässt sich durch pharmakologische Beeinflussung dieser Mechanismen die Neurotoxizität verringern.

6. Literaturverzeichnis

- Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F. und Starke, K. (2005): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban und Fischer Verlag (Band 9. Auflage).
- Asato, R.; Akiyama, Y.; Ito, M.; Kubota, M.; Okumura, R.; Miki, Y.; Konishi, J. und Mikawa, H. (1992): Nuclear magnetic resonance abnormalities of the cerebral white matter in children with acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma during and after central nervous system prophylactic treatment with intrathecal methotrexate, *Cancer* (Band 70), Nr. 7, Seite 1997-2004.
- Barinaga, M. (1996): Forging a path to cell death, *Science* (Band 273), Nr. 5276, Seite 735-7.
- Benveniste, H.; Drejer, J.; Schousboe, A. und Diemer, N. H. (1984): Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis, *J Neurochem* (Band 43), Nr. 5, Seite 1369-74.
- Boaziz, C.; Breau, J. L.; Morere, J. F. und Israel, L. (1991): [The blood-brain barrier: implications for chemotherapy in brain tumors], *Pathol Biol (Paris)* (Band 39), Nr. 8, Seite 789-95.
- Borovitskaya, A. E.; Evtushenko, V. I. und Sabol, S. L. (1996): Gamma-radiation-induced cell death in the fetal rat brain possesses molecular characteristics of apoptosis and is associated with specific messenger RNA elevations, *Brain Res Mol Brain Res* (Band 35), Nr. 1-2, Seite 19-30.
- Bossy-Wetzel, E.; Bakiri, L. und Yaniv, M. (1997): Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun, *Embo J* (Band 16), Nr. 7, Seite 1695-709.
- Bossy-Wetzel, E.; Barsoum, M. J.; Godzik, A.; Schwarzenbacher, R. und Lipton, S. A. (2003): Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging, *Curr Opin Cell Biol* (Band 15), Nr. 6, Seite 706-16.
- Bregman, C. L.; Buroker, R. A.; Hirth, R. S.; Crosswell, A. R. und Durham, S. K. (1994): Etoposide- and BMY-40481-induced sensory neuropathy in mice, *Toxicol Pathol* (Band 22), Nr. 5, Seite 528-35.
- Brown, R. T.; Sawyer, M. G.; Antoniou, G.; Toogood, I. und Rice, M. (1999): Longitudinal follow-up of the intellectual and academic functioning of children receiving central nervous system-prophylactic chemotherapy for leukemia: a four-year final report, *J Dev Behav Pediatr* (Band 20), Nr. 5, Seite 373-7.
- Charriat_Marlangue, C. und Ben_Ari, Y. (1995): A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis., *Neuroreport* (Band 7), Nr. 1, Seite 61-4. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/results?uid=MDLN.96352159>

- Choi, D. W. (1996): Ischemia-induced neuronal apoptosis, *Curr Opin Neurobiol* (Band 6), Nr. 5, Seite 667-72.
- Colicos, M. A. und Dash, P. K. (1996): Apoptotic morphology of dentate gyrus granule cells following experimental cortical impact injury in rats: possible role in spatial memory deficits, *Brain Res* (Band 739), Nr. 1-2, Seite 120-31.
- Colvin, O. M. (1999): An overview of cyclophosphamide development and clinical applications, *Curr Pharm Des* (Band 5), Nr. 8, Seite 555-60.
- Creutzig, U (2005): Therapieerfolge,
http://www.kinderkrebsinfo.de/e1664/e1680/e1719/index_ger_html. URL:
http://www.kinderkrebsinfo.de/e1664/e1680/e1719/index_ger_html
- Crowe, M. J.; Bresnahan, J. C.; Shuman, S. L.; Masters, J. N. und Beattie, M. S. (1997): Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys, *Nat Med* (Band 3), Nr. 1, Seite 73-6.
- Cruz_Orive, L.M. und Weibel, E.R. (1990): Recent stereological methods for cell biology: a brief survey., *American Journal of Physiology* (Band 258), Nr. 4 Pt 1, Seite L148-56. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/results?uid=MDLN.90240386>
- DeOlmos, J.S. und Ingram, W.R. (1971): An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration., *Brain Research* (Band 33), Nr. 2, Seite 523-9. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/results?uid=MDLN.72084953>
- Dikranian, K.; Ishimaru, M. J.; Tenkova, T.; Labruyere, J.; Qin, Y. Q.; Ikonomidou, C. und Olney, J. W. (2001): Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain, *Neurobiol Dis* (Band 8), Nr. 3, Seite 359-79.
- Dobbing, J. (1974): The later growth of the brain and its vulnerability, *Pediatrics* (Band 53), Nr. 1, Seite 2-6.
- Dobbing, J. (1974): The later growth of the brain and its vulnerability., *Pediatrics* (Band 53), Nr. 1, Seite 2-6. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/results?uid=MDLN.74066829>
- el-Badawi, M. G.; Fatani, J. A.; Bahakim, H. und Abdalla, M. A. (1990): Light and electron microscopic observations on the cerebellum of guinea pigs following low-dose methotrexate, *Exp Mol Pathol* (Band 53), Nr. 3, Seite 211-22.
- Forman, A. (1990): Recent studies on neurotoxicity and on the epidemiology of brain and nervous system tumors, *Curr Opin Oncol* (Band 2), Nr. 4, Seite 691-8.
- Friesen, C.; Herr, I.; Krammer, P. H. und Debatin, K. M. (1996): Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells, *Nat Med* (Band 2), Nr. 5, Seite 574-7.

- Fuchs, H. E.; Archer, G. E.; Colvin, O. M.; Bigner, S. H.; Schuster, J. M.; Fuller, G. N.; Muhlbaier, L. H.; Schold, S. C., Jr.; Friedman, H. S. und Bigner, D. D. (1990): Activity of intrathecal 4-hydroperoxycyclophosphamide in a nude rat model of human neoplastic meningitis, *Cancer Res* (Band 50), Nr. 6, Seite 1954-9.
- Fulda, S.; Strauss, G.; Meyer, E. und Debatin, K. M. (2000): Functional CD95 ligand and CD95 death-inducing signaling complex in activation-induced cell death and doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells, *Blood* (Band 95), Nr. 1, Seite 301-8.
- Garcia-Tena, J.; Lopez-Andreu, J. A.; Ferris, J.; Menor, F.; Mulas, F.; Millet, E. und Verdeguer, A. (1995): Intrathecal chemotherapy-related myeloencephalopathy in a young child with acute lymphoblastic leukemia, *Pediatr Hematol Oncol* (Band 12), Nr. 4, Seite 377-85.
- Gavrieli, Y.; Sherman, Y. und Ben_Sasson, S.A. (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation., *Journal of Cell Biology* (Band 119), Nr. 3, Seite 493-501. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/results?uid=MDLN.93016262>
- Globus, M. Y.; Busto, R.; Dietrich, W. D.; Martinez, E.; Valdes, I. und Ginsberg, M. D. (1988): Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis, *J Neurochem* (Band 51), Nr. 5, Seite 1455-64.
- Golstein, P. (1997): Controlling cell death, *Science* (Band 275), Nr. 5303, Seite 1081-2.
- Gozdz, A.; Habas, A.; Jaworski, J.; Zielinska, M.; Albrecht, J.; Chlystun, M.; Jalili, A. und Hetman, M. (2003): Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the neuroprotective activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 by cisplatin, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 44, Seite 43663-71.
- Graham, M. L.; Herndon, J. E., 2nd; Casey, J. R.; Chaffee, S.; Ciocci, G. H.; Krischer, J. P.; Kurtzberg, J.; Laughlin, M. J.; Longee, D. C.; Olson, J. F.; Paleologus, N.; Pennington, C. N. und Friedman, H. S. (1997): High-dose chemotherapy with autologous stem-cell rescue in patients with recurrent and high-risk pediatric brain tumors, *J Clin Oncol* (Band 15), Nr. 5, Seite 1814-23.
- Grasl_Kraupp, B.; Ruttkay_Nedecky, B.; Koudelka, H.; Bukowska, K.; Bursch, W. und Schulte_Hermann, R. (1995): In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note., *Hepatology* (Band 21), Nr. 5, Seite 1465-8. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/results?uid=MDLN.95255820>
- Gurney, J. G.; Severson, R. K.; Davis, S. und Robison, L. L. (1995): Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type, *Cancer* (Band 75), Nr. 8, Seite 2186-95.
- Ha, H. C. und Snyder, S. H. (2000): Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the nervous system, *Neurobiol Dis* (Band 7), Nr. 4, Seite 225-39.

- Hengartner, M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis, *Nature* (Band 407), Nr. 6805, Seite 770-6.
- Henze, G. (1997): Childhood acute lymphoblastic leukaemia, *Eur J Cancer* (Band 33), Nr. 1, Seite 8-9.
- Henze, G.; Langermann, H. J.; Ritter, J.; Schellong, G. und Riehm, H. (1981): Treatment strategy for different risk groups in childhood acute lymphoblastic leukemia: A Report From the BFM Study Group, *Haematol Blood Transfus* (Band 26), Seite 87-93.
- Highley, M.; Meller, S. T. und Pinkerton, C. R. (1992): Seizures and cortical dysfunction following high-dose cisplatin administration in children, *Med Pediatr Oncol* (Band 20), Nr. 2, Seite 143-8.
- Hook, C. C.; Kimmel, D. W.; Kvols, L. K.; Scheithauer, B. W.; Forsyth, P. A.; Rubin, J.; Moertel, C. G. und Rodriguez, M. (1992): Multifocal inflammatory leukoencephalopathy with 5-fluorouracil and levamisole, *Ann Neurol* (Band 31), Nr. 3, Seite 262-7.
- Hu, Y.; Benedict, M. A.; Ding, L. und Nunez, G. (1999): Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis, *Embo J* (Band 18), Nr. 13, Seite 3586-95.
- Hussain, M.; Wozniak, A. J. und Edelstein, M. B. (1993): Neurotoxicity of antineoplastic agents, *Crit Rev Oncol Hematol* (Band 14), Nr. 1, Seite 61-75.
- Ikonomidou, C.; Bosch, F.; Miksa, M.; Bittigau, P.; Vockler, J.; Dikranian, K.; Tenkova, T. I.; Stefovskaja, V.; Turski, L. und Olney, J. W. (1999): Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain, *Science* (Band 283), Nr. 5398, Seite 70-4.
- Ikonomidou, C.; Mosinger, J. L.; Salles, K. S.; Labruyere, J. und Olney, J. W. (1989): Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-aspartate neurotoxicity, *J Neurosci* (Band 9), Nr. 8, Seite 2809-18.
- Ikonomidou, C.; Price, M. T.; Mosinger, J. L.; Friedrich, G.; Labruyere, J.; Salles, K. S. und Olney, J. W. (1989): Hypobaric-ischemic conditions produce glutamate-like cytopathology in infant rat brain, *J Neurosci* (Band 9), Nr. 5, Seite 1693-700.
- Ikonomidou, C.; Qin, Y.; Labruyere, J.; Kirby, C. und Olney, J. W. (1996): Prevention of trauma-induced neurodegeneration in infant rat brain, *Pediatr Res* (Band 39), Nr. 6, Seite 1020-7.
- Ikonomidou, C.; Stefovskaja, V. und Turski, L. (2000): Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 97), Nr. 23, Seite 12885-90.
- Inamura, T.; Nomura, T.; Bartus, R. T. und Black, K. L. (1994): Intracarotid infusion of RMP-7, a bradykinin analog: a method for selective drug delivery to brain tumors, *J Neurosurg* (Band 81), Nr. 5, Seite 752-8.

- Ishimaru, M. J.; Ikonomidou, C.; Tenkova, T. I.; Der, T. C.; Dikranian, K.; Sesma, M. A. und Olney, J. W. (1999): Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain, *J Comp Neurol* (Band 408), Nr. 4, Seite 461-76.
- Jain, R. K. (1989): Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies, *J Natl Cancer Inst* (Band 81), Nr. 8, Seite 570-6.
- Kaatsch P, Spix C, Michaelis J (2002): German childhood cancer registry-annual report 2000 (Jahresbericht 2000 des Deutschen Kinderkrebsregisters), Deutsches Kinderkrebsregister, ed 2002.
- Kaplan, R. S. und Wiernik, P. H. (1982): Neurotoxicity of antineoplastic drugs, *Semin Oncol* (Band 9), Nr. 1, Seite 103-30.
- Keime-Guibert, F.; Napolitano, M. und Delattre, J. Y. (1998): Neurological complications of radiotherapy and chemotherapy, *J Neurol* (Band 245), Nr. 11, Seite 695-708.
- Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* (Band 26), Nr. 4, Seite 239-57.
- Kim, R.; Tanabe, K.; Uchida, Y.; Emi, M.; Inoue, H. und Toge, T. (2002): Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy, *Cancer Chemother Pharmacol* (Band 50), Nr. 5, Seite 343-52.
- Kramer, J. H.; Crittenden, M. R.; DeSantes, K. und Cowan, M. J. (1997): Cognitive and adaptive behavior 1 and 3 years following bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplant* (Band 19), Nr. 6, Seite 607-13.
- Kroemer, G. (1997): The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis, *Nat Med* (Band 3), Nr. 6, Seite 614-20.
- Lawen, A. (2003): Apoptosis-an introduction, *Bioessays* (Band 25), Nr. 9, Seite 888-96.
- Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S. M.; Ahmad, M.; Alnemri, E. S. und Wang, X. (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell* (Band 91), Nr. 4, Seite 479-89.
- Lipton, S. A. und Rosenberg, P. A. (1994): Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders, *N Engl J Med* (Band 330), Nr. 9, Seite 613-22.
- Liu, X. Z.; Xu, X. M.; Hu, R.; Du, C.; Zhang, S. X.; McDonald, J. W.; Dong, H. X.; Wu, Y. J.; Fan, G. S.; Jacquin, M. F.; Hsu, C. Y. und Choi, D. W. (1997): Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury, *J Neurosci* (Band 17), Nr. 14, Seite 5395-406.

- Macdonald, D. R. (1991): Neurologic complications of chemotherapy, *Neurol Clin* (Band 9), Nr. 4, Seite 955-67.
- MacDonald, T. J.; Rood, B. R.; Santi, M. R.; Vezina, G.; Bingaman, K.; Cogen, P. H. und Packer, R. J. (2003): Advances in the diagnosis, molecular genetics, and treatment of pediatric embryonal CNS tumors, *Oncologist* (Band 8), Nr. 2, Seite 174-86.
- Miyashita, K.; Abe, H.; Nakajima, T.; Ishikawa, A.; Nishiura-Suzuki, M.; Naritomi, H.; Tanaka, R. und Sawada, T. (1994): Glutamate release in the gerbil hippocampus after middle cerebral artery occlusion, *Neuroreport* (Band 5), Nr. 8, Seite 945-8.
- Mizutani, T (1995): Neurologic complications of cancer. Their pathogenesis and management., *Biotherapy* (Band 9), Seite 1472-1479.
- Muller, M.; Wilder, S.; Bannasch, D.; Israeli, D.; Lehlbach, K.; Li-Weber, M.; Friedman, S. L.; Galle, P. R.; Stremmel, W.; Oren, M. und Krammer, P. H. (1998): p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs, *J Exp Med* (Band 188), Nr. 11, Seite 2033-45.
- Murphy, A. N.; Fiskum, G. und Beal, M. F. (1999): Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death, *J Cereb Blood Flow Metab* (Band 19), Nr. 3, Seite 231-45.
- Olney, J. W. (1971): Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study, *J Neuropathol Exp Neurol* (Band 30), Nr. 1, Seite 75-90.
- Olney, J. W. (2003): Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders, *Curr Opin Pharmacol* (Band 3), Nr. 1, Seite 101-9.
- Olney, J. W.; Adamo, N. J. und Ratner, A. (1971): Monosodium glutamate effects, *Science* (Band 172), Nr. 980, Seite 294.
- Packer, R. J. (1995): Brain tumors in children, *Curr Opin Pediatr* (Band 7), Nr. 1, Seite 64-72.
- Palmer, S. L.; Goloubeva, O.; Reddick, W. E.; Glass, J. O.; Gajjar, A.; Kun, L.; Merchant, T. E. und Mulhern, R. K. (2001): Patterns of intellectual development among survivors of pediatric medulloblastoma: a longitudinal analysis, *J Clin Oncol* (Band 19), Nr. 8, Seite 2302-8.
- Park, D. S.; Morris, E. J.; Padmanabhan, J.; Shelanski, M. L.; Geller, H. M. und Greene, L. A. (1998): Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents, *J Cell Biol* (Band 143), Nr. 2, Seite 457-67.
- Park, D. S.; Morris, E. J.; Stefanis, L.; Troy, C. M.; Shelanski, M. L.; Geller, H. M. und Greene, L. A. (1998): Multiple pathways of neuronal death induced by DNA-damaging agents, NGF deprivation, and oxidative stress, *J Neurosci* (Band 18), Nr. 3, Seite 830-40.

- Perry, M. C. (2001): The Chemotherapy Source Book, Lippincott Williams and Wilkins (Band Third Edition).
- Persson, L. und Hillered, L. (1992): Chemical monitoring of neurosurgical intensive care patients using intracerebral microdialysis, *J Neurosurg* (Band 76), Nr. 1, Seite 72-80.
- Phipps, S.; Dunavant, M.; Srivastava, D. K.; Bowman, L. und Mulhern, R. K. (2000): Cognitive and academic functioning in survivors of pediatric bone marrow transplantation, *J Clin Oncol* (Band 18), Nr. 5, Seite 1004-11.
- Ravindranath, Y. (2003): Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia, *Curr Opin Oncol* (Band 15), Nr. 1, Seite 23-35.
- Reddy, A. T. und Witek, K. (2003): Neurologic complications of chemotherapy for children with cancer, *Curr Neurol Neurosci Rep* (Band 3), Nr. 2, Seite 137-42.
- Robison, L. L. und Bhatia, S. (2003): Late-effects among survivors of leukaemia and lymphoma during childhood and adolescence, *Br J Haematol* (Band 122), Nr. 3, Seite 345-59.
- Rothman, S. (1984): Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death, *J Neurosci* (Band 4), Nr. 7, Seite 1884-91.
- Rothman, S. M. und Olney, J. W. (1995): Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years, *Trends Neurosci* (Band 18), Nr. 2, Seite 57-8.
- Rubnitz, J. E. und Pui, C. H. (2003): Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukaemia, *Cancer Treat Rev* (Band 29), Nr. 1, Seite 31-44.
- Rutkowski, S. (2003): HIT 2000, http://www.kinderkrebsinfo.de/e1664/e1676/e1758/e5466/index_ger.html. URL: http://www.kinderkrebsinfo.de/e1664/e1676/e1758/e5466/index_ger.html
- Rzeski, W.; Jansma, C.; Reiher, A.K.; Bosch, F.; Bittigau, P.; Vöckler, J. und Ikonomidou, C. (1998): Excitotoxicity and apoptosis mediate neuronal toxicity of cytostatic agents, Society for Neuroscience 27th Annual Meeting, Los Angeles, CA.
- Rzeski, W.; Pruskil, S.; Macke, A.; Felderhoff-Mueser, U.; Reiher, A. K.; Hoerster, F.; Jansma, C.; Jarosz, B.; Stefovská, V.; Bittigau, P. und Ikonomidou, C. (2004): Anticancer agents are potent neurotoxins in vitro and in vivo, *Ann Neurol* (Band 56), Nr. 3, Seite 351-60.
- Shapiro, W. R.; Green, S. B.; Burger, P. C.; Selker, R. G.; VanGilder, J. C.; Robertson, J. T.; Mealey, J., Jr.; Ransohff, J. und Mahaley, M. S., Jr. (1992): A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous BCNU, with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma, *J Neurosurg* (Band 76), Nr. 5, Seite 772-81.

- Silverstein, F. S.; Buchanan, K. und Johnston, M. V. (1986): Perinatal hypoxia-ischemia disrupts striatal high-affinity [3H]glutamate uptake into synaptosomes, *J Neurochem* (Band 47), Nr. 5, Seite 1614-9.
- Simms, S.; Kazak, A. E.; Golomb, V.; Goldwein, J. und Bunin, N. (2002): Cognitive, behavioral, and social outcome in survivors of childhood stem cell transplantation, *J Pediatr Hematol Oncol* (Band 24), Nr. 2, Seite 115-9.
- Solary, E.; Droin, N.; Bettaieb, A.; Corcos, L.; Dimanche-Boitrel, M. T. und Garrido, C. (2000): Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies, *Leukemia* (Band 14), Nr. 10, Seite 1833-49.
- Soud, A. K.; Tacka, K. A.; Galvan, K. A. und Penefsky, H. S. (2003): Immediate effects of anticancer drugs on mitochondrial oxygen consumption, *Biochem Pharmacol* (Band 66), Nr. 6, Seite 977-87.
- Steinberg, S.; Hartmann, R.; Wisniewski, S.; Berger, K.; Beck, J. D. und Henze, G. (1998): [Late sequelae of CNS recurrence of acute lymphoblastic leukemia in childhood], *Klin Padiatr* (Band 210), Nr. 4, Seite 200-6.
- Steller, H. (1995): Mechanisms and genes of cellular suicide, *Science* (Band 267), Nr. 5203, Seite 1445-9.
- Tallen, Gesche (2003): Bösartige Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen, http://www.kinderkrebsinfo.de/e1664/e1676/e1682/index_ger.html. URL: http://www.kinderkrebsinfo.de/e1664/e1676/e1682/index_ger.html
- Tallen, Gesche (2003): Therapieerfolge,**
<http://www.kinderkrebsinfo.de/info/fachpublikum/diagnoseundbehandlung/Therapieerfolge>
- Tecoma, E. S.; Monyer, H.; Goldberg, M. P. und Choi, D. W. (1989): Traumatic neuronal injury in vitro is attenuated by NMDA antagonists, *Neuron* (Band 2), Nr. 6, Seite 1541-5.
- Thompson, C. B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* (Band 267), Nr. 5203, Seite 1456-62.
- Uchiyama-Tsuyuki, Y.; Araki, H.; Yae, T. und Otomo, S. (1994): Changes in the extracellular concentrations of amino acids in the rat striatum during transient focal cerebral ischemia, *J Neurochem* (Band 62), Nr. 3, Seite 1074-8.
- Vaux, D. L. und Korsmeyer, S. J. (1999): Cell death in development, *Cell* (Band 96), Nr. 2, Seite 245-54.
- Verstappen, C. C.; Heimans, J. J.; Hoekman, K. und Postma, T. J. (2003): Neurotoxic complications of chemotherapy in patients with cancer: clinical signs and optimal management, *Drugs* (Band 63), Nr. 15, Seite 1549-63.

- Wallace, T. L. und Johnson, E. M., Jr. (1989): Cytosine arabinoside kills postmitotic neurons: evidence that deoxycytidine may have a role in neuronal survival that is independent of DNA synthesis, *J Neurosci* (Band 9), Nr. 1, Seite 115-24.
- Wallach, D. (1997): Apoptosis. Placing death under control, *Nature* (Band 388), Nr. 6638, Seite 123, 125-6.
- Whitehead, V. M.; Vuchich, M. J.; Lauer, S. J.; Mahoney, D.; Carroll, A. J.; Shuster, J. J.; Esseltine, D. W.; Payment, C.; Look, A. T.; Akabutu, J. und et al. (1992): Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study, *Blood* (Band 80), Nr. 5, Seite 1316-23.
- Williams, G. T. und Smith, C. A. (1993): Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death, *Cell* (Band 74), Nr. 5, Seite 777-9.
- Yim, Y. S.; Mahoney, D. H., Jr. und Oshman, D. G. (1991): Hemiparesis and ischemic changes of the white matter after intrathecal therapy for children with acute lymphocytic leukemia, *Cancer* (Band 67), Nr. 8, Seite 2058-61.
- Zhou, B. B. und Elledge, S. J. (2000): The DNA damage response: putting checkpoints in perspective, *Nature* (Band 408), Nr. 6811, Seite 433-9.

7. Anhang

7.1 Publikationen

- Rzeski, W., Pruskil, S., et al. (2004).
Anticancer agents are potent neurotoxins in vitro and in vivo.
Ann Neurol **56**(3): 351-60.
- Pruskil, S., Georg, W., et al.(2004).
Special Study Modules training research competences in the Reformed Curriculum at the Medical Faculty, Berlin.
In: Abstractband 2.12. AMEE (Association for Medical Education in Europe), 5.-8.9., Edinburgh.
- Schnabel, K., Pruskil, S., et al. (2004).
Students' view of Studium Generale in the Reformed Medical Curriculum (RMC) in Berlin.
In: Abstractband 2.12. AMEE (Association for Medical Education in Europe), 5.-8.9., Edinburgh.
- Pruskil, S, Drandarevski A (2002)
Do we need guidelines on how to write cases in a pbl curriculum
In: Abstractband 3C4 AMEE (Association for Medical Education in Europe) Lisabon
- Pruskil, S, Pesditschek, S, et. al (2000)
Role conflict in medicine: is it possible to be a good researcher, clinician and teacher at the same time?
In: Abstractband 6F/1 AMEE (Association for Medical Education in Europe) Beer Sheva
- Pruskil, S, Pesditschek, S, et. al (1999)
Problems encountered in implementing an evaluation concept for the Charité.
Med Teach, 2000. **22**(1): p. 81 Kongress-Abstract
- Pruskil, S, Pesditschek, S, et. al (1998)
Has evaluation designed by students any influence on medical education?
Med Teach, 1999. **21**(1): p. 101 Kongress-Abstract

Vorträge

- Pruskil, S, Siewczynski, R, Pesditschek, S, Bauknecht, C (1999)
Problems encountered in implementing an evaluation concept for the Charité.
Eröffnungssymposium des Reformstudiengangs Medizin, Berlin
- Pruskil, S (2001)
Keeping standards up to date
Vortrag im Rahmen der Abschlußplenary, AMEE (Association for Medical Education in Europe) Berlin

Preise

- Medical Teacher Poster Prize 1999, AMEE Konferenz Linköping
Problems encountered in implementing an evaluation concept for the Charité.
Pruskil, S, Pesditschek, S, Bauknecht, C

7.2 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Susanne Pruskil, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die neurotoxische Wirkung der Zytostatika Cyclophosphamid und Thiotepa im infantilen Gehirn der Ratte“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum 17.07.2005

7.3 Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Hrisanthi Ikonomidou für die Überlassung des Themas, die vielfältige Unterstützung und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Für die fachliche und praktische Unterstützung danke ich der gesamten AG Ikonomidou, insbesondere Vanya Stefovskaja, Marco Sifringer, Jessica Fassbender und Stefanie Pesdischek.

Besonderer Dank gilt Michel Knigge für die qualifizierte statistische Beratung und meinem guten Freund Markus Junger für das Korrekturlesen.

Für seine unermüdliche, immer geduldige Unterstützung und sein Verständnis danke ich meinem Freund Thomas von Münster.