

Peter Reinacher
Dr.med.

Zelluläre Spätfolgen nach stereotaktischer Bestrahlung am Rattengehirn

Geboren am 4.4.1970 in Waldshut
Reifeprüfung am 8.5.1990 in Leonberg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/93 bis WS1998/99
Physikum am 28.9.1994 an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Klinisches Studium in Mannheim, Universität Heidelberg
Praktisches Jahr in Baltimore/Maryland, USA und Heidelberg
Staatsexamen am 10.5.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Radiologie

Doktorvater: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. Jürgen Debus

Die Möglichkeiten der Radiochirurgie im ZNS werden begrenzt durch die Strahlentoleranz des Gewebes, das im Zielvolumen liegt und an dieses angrenzt. Die Untersuchung der Reaktion von gesundem Hirngewebe auf Bestrahlung ist daher von klinischer Relevanz. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Strahlenspätfolgen nach stereotaktischer Bestrahlung von sphärischen Zielvolumina in der rechten Hemisphäre von Rattengehirnen auf zellulärer Ebene zu untersuchen.

Die Bestrahlung der Ratten erfolgte mit einem Linearbeschleuniger. Insgesamt wurden 60 Tiere mit verschiedenen Dosen und Volumina bestrahlt. Nach einer Latenzzeit von 10 und 19 Monaten wurden die Tiere getötet und die Gehirne mit verschiedenen histologischen, enzymhistochemischen, immunhistochemischen und enzym-immunhistochemischen Methoden untersucht. Neben Übersichtsfärbungen wie Hämotoxilin-Eosin und Nissl Färbung wurde mit einem Tetrazoliumsals enzymhistochemisch die Aktivität mitochondrialer Enzyme untersucht. Mikroglia und Astrozyten wurden immunhistochemisch mit Ox-42 und Anti-GFAP Antikörpern gefärbt. Es wurde in dieser Arbeit ein System entwickelt, das es ermöglicht, die Reaktion der so markierten Zellen mit Hilfe computergestützter Bildanalyse zu quantifizieren.

Zum Nachweis von Apoptose wurden zwei Varianten der enzym-immunhistochemischen TUNEL-Technik eingesetzt. Eine dieser Varianten wurde so modifiziert, daß sie auf Gewebsschnitten anwendbar wurde.

Die Übersichtsfärbungen und die enzymhistochemische Untersuchung der mitochondrialen Enzymaktivität zeigten im Seitenvergleich nach 10 Monaten keine Reaktion bei den mit 20 bis 50 Gy behandelten Tieren. Bei den mit 100 Gy bestrahlten Gehirnen manifestierten sich zu diesem Zeitpunkt ausgeprägte Radionekrosen. Nach 19 Monaten konnten auch bei den mit 50 Gy behandelten Tieren Nekrosen gefunden werden.

Die immunhistochemische Untersuchung der Astrozytenreaktion mit Anti-GFAP Antikörpern zeigte beim Vergleich des bestrahlten Gebietes mit der entsprechenden Region der kontralateralen Hemisphäre einen signifikanten Anstieg der mit Hilfe computergestützter Bildanalyse gemessenen Zellflächen. Dieser manifestierte sich nach 10 Monaten bei den Tieren, die mit 40 Gy (3mm Kollimator) und mit 50 Gy bestrahlt worden waren. Zum gleichen Zeitpunkt war die Astrozytenzahl nur nach Behandlung mit 50 Gy signifikant erhöht. Nach 19 Monaten war der Anstieg der Astrozytenzellfläche bei den Tieren, die mit mehr als 30 Gy bestrahlt worden waren, der der Astrozytenzahl nur nach 40 Gy (3mm) und 50 Gy, signifikant.

Die Mikrogliazellen wurden mit monoklonalen Ox-42 Antikörpern immunhistochemisch gefärbt. Die Auswertung mit der Bildanalyseeinheit ergab im Seitenvergleich einen

signifikanten Anstieg der Ox-42 positiven Flächen nach 10 Monaten bei den mit 30 Gy (3mm) und allen höheren Dosen behandelten Tieren. Zum gleichen Zeitpunkt war die Zellzahl der Mikroglia nur nach Behandlung mit 30 Gy (3mm) und 40 Gy (3mm) signifikant erhöht. Nach 19 Monaten konnte bei allen Tieren, die mit mehr als 20 Gy behandelt wurden, ein signifikanter Anstieg der Ox-42 positiven Fläche gemessen werden, während die Zellzahl erst nach mehr als 30 Gy einen signifikanten Unterschied im Seitenvergleich zeigte.

Die Mikrogliareaktion trat also zu beiden Untersuchungszeitpunkten nach schon geringeren Dosen auf, als die Reaktion der Astrozyten. Bei beiden Zelltypen erwies sich die in dieser Arbeit entwickelte Methode mit Hilfe computergestützter Bildanalyse als sensitiver in der Detektion der Zellreaktion, als das in vielen Studien verwendete Auszählen der Zellen. Dies kann zum Teil daran liegen, daß mit ihr auch eine Änderung der Morphologie der Zellen erfaßt wird. Die Tatsache, daß die unbehandelten (linken) Hemisphären sehr konstante Werte in dieser Messung haben, deutet auf eine hohe statistische Sicherheit der computergestützten Methode hin.

Mit der TUNEL-Technik konnte DNA-Degradation bei den mit 50 Gy behandelten Tieren zu beiden Untersuchungszeitpunkten, sowie bei den mit 100 Gy behandelten Tieren zum ersten und einzigen Untersuchungszeitpunkt, festgestellt werden. Die Gehirne nach Bestrahlung mit 100 Gy, sowie die nach 50 Gy zum zweiten Untersuchungszeitpunkt, zeigten ausgeprägte Nekrosen,- nicht jedoch die mit 50 Gy behandelten Gehirne nach 10 Monaten (also zum ersten Untersuchungszeitpunkt), bei denen die Morphologie der TUNEL-positiven Zellen nicht der von nekrotischen Zellen entsprach, weshalb bei diesen Tieren von einer Beteiligung von Apoptose ausgegangen werden kann.

Es konnte gezeigt werden, daß nach stereotaktischer Bestrahlung zelluläre Veränderungen der Bildung von Nekrosen vorausgehen. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten war die Reaktion der Mikroglia nach kleineren Dosen zu messen, als die der Astrozyten. Das in dieser Arbeit entwickelte System zum Quantifizieren der Zellflächen war bei beiden Zelltypen sensitiver als das Zählen der Zellen. Hypertrophie der Zellen wird von dieser Methode mit erfaßt. Die Hypertrophie von Astrozyten oder Mikroglia wird in vielen Studien mit Hilfe subjektiver, linearer Eiteilungen untersucht, die von dieser neuen Methode profitieren könnten.

Die TUNEL-positiven Zellen 10 Monate nach Behandlung mit 50 Gy, ohne Anzeichen für Nekrosen, deuten auf eine Beteiligung von Apoptose bei der Pathogenese der Strahlenspätfolgen hin. Zahlreiche Mediatoren von Mikroglia und Astrozyten können diese induzieren.

Wenn Mikroglia an den Folgen der Bestrahlung in ähnlicher Weise beteiligt sind wie an anderen Prozessen, z.B. beim Schlaganfall, so könnten - wie dort - Substanzen, die Ihre Aktivierung supprimieren, dazu dienen, die Spätfolgen zu verringern. Die in dieser Arbeit etablierten Methoden können in zukünftigen Studien dazu verwendet werden, die Wirkung einiger dieser Substanzen nach stereotaktischer Bestrahlung experimentell zu untersuchen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Rolle von Apoptose bei Strahlenspätfolgen, auf die die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hindeuten, genauer zu klären.