



La barrière hémato-encéphalique : un facteur clé en Neuro-oncologie

D. Fortin

Département de Neurochirurgie et Neuro-oncologie, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

Reçu le : 25/06/2003 ; Reçu en révision le : 23/09/2003 ; Accepté le : 05/12/2003.

RÉSUMÉ

Introduction. La barrière hémato-encéphalique représente un obstacle physiologique à l'acheminement de molécules thérapeutiques dans le traitement des tumeurs cérébrales. **États des connaissances.** Essentiellement situé au niveau des jonctions serrées joignant les cellules endothéliales vasculaires cérébrales, cet obstacle limite l'entrée des molécules non liposolubles et ayant un poids moléculaire supérieur à 500 Dalton. Afin de contourner cet obstacle, différentes stratégies ont été proposées. L'une d'elles est l'ouverture osmotique de la barrière hémato-encéphalique. Cette approche implique la perfusion d'une solution hyperosmolaire intra-artérielle dans une distribution vasculaire donnée afin d'en augmenter transitoirement la perméabilité. L'osmolarité de la solution ainsi que le temps d'exposition des cellules endothéliales à la solution sont des facteurs essentiels dans la réussite de cette approche. **Perspectives.** Le rationnel de cette approche est présenté dans cette revue, ainsi que les différentes études pré-cliniques, incluant la description des modèles animaux utilisés dans l'élaboration de cette technique. Nous discutons ensuite de l'expérience clinique acquise. La procédure est considérée comme relativement bien tolérée avec un taux de complication limité. Enfin, les données Sherbrookoises quant à l'efficacité sont présentées et discutées. **Conclusions.** Une médiane de survie de 138 semaines observée chez les patients porteurs de glioblastome nous encourage à poursuivre nos efforts de recherche dans cette stratégie.

Mots-clés : Barrière hémato-encéphalique • Ouverture osmotique de la barrière hémato-encéphalique • Tumeurs cérébrales • Gliomes • Chimiothérapie intra-artérielle

SUMMARY

The blood-brain barrier should not be underestimated in neuro-oncology.

D. Fortin, Rev Neurol (Paris) 2004; 160: 5, 523-532.

Introduction. Limited therapeutic success in the treatment of CNS neoplasia with chemotherapy is generally attributed to two factors: natural or acquired resistance to chemotherapy expressed by tumor cells, and delivery impediment related to the blood-brain barrier.

State of art. The anatomic and physiological properties of the normal blood-brain barrier prevent passage of ionized water-soluble compounds with a molecular weight greater than 500 Daltons. Although complex, the blood-brain barrier basically functions at the level of the tight junctions of the cerebral vascular endothelial cells. Different approaches have been advocated to improve delivery across the blood-brain barrier. One such approach, transient osmotic permeabilization of the blood-brain barrier, is an invasive procedure offering the potential of global delivery. This strategy involves cerebral intravascular infusion of a hypertonic solution to produce, in a given cerebral distribution (carotid or vertebral), producing a transient increase in blood-brain barrier permeability. Two parameters are paramount in the ability to mediate a hyperosmolar modification of the barrier: the osmolality of the solution, and the infusion time. The procedure has been found to produce a marked increase (10- to 100-fold) in brain and cerebrospinal fluid concentrations of methotrexate and of other markers. **Perspectives.** Pre-clinical studies are underway to assess the use of this procedure to improve delivery of different molecules, including standard chemotherapy, monoclonal antibodies and gene therapy molecules. This approach has been standardized for clinical use. It has been extensively used in patients. Using a standard protocol of osmotic blood-brain barrier disruption to enhance chemotherapy delivery with three different chemotherapy regimens, more than 3000 procedures have been performed in more than 300 patients across the blood-brain barrier distribution consortium, an entity which includes six university centers coordinated by the Oregon Health Sciences University. The procedure has been found to be safe, with very limited toxicity. As part of this consortium, the Sherbrooke University center has been offering this treatment modality since November 1999. We have performed more than 500 procedures in 122 patients with various histologies (malignant gliomas, primary central nervous system lymphoma and metastasis) with low toxicity. **Conclusions.** In our view, the median survival rate of 138 weeks obtained with glioblastoma multiforme patients is promising; further research to improve these results is needed.

Keywords: Blood-brain barrier • Blood-brain barrier disruption • Brain tumors • Gliomas • Intra-arterial chemotherapy.

Tirés à part : D. FORTIN, Département de Neurochirurgie et Neuro-oncologie, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Sherbrooke, J1H 5N4, Québec, Canada. E-mail : david.fortin@USherbrooke.ca

INTRODUCTION

Le traitement des tumeurs cérébrales primitives malignes représente un défi de taille. Ce sont des lésions hautement agressives et infiltrantes, rendant une résection chirurgicale complète hors du domaine du possible. De fait, plusieurs études ont clairement documenté la présence de cellules néoplasiques à distance des anomalies de signaux en T2 à la résonance magnétique (Earnest 4th *et al.*, 1988). Qui plus est, des échantillons prélevés à distance de ces anomalies de signal et d'apparence normale à la pathologie ont produit une croissance de cellules néoplasiques lorsqu'ils ont été mis en culture. Cela signifie que des cellules néoplasiques dormantes reposaient, occultes, dans l'arrière plan parenchymateux, par ailleurs, d'apparence normale microscopiquement (Silbergeld et Chicoine, 1997).

Considérant ces éléments, il devient logique d'identifier d'emblée la maladie néoplasique gliale comme une maladie diffuse, et non comme une pathologie locale ou régionale. Les modalités de traitement local (chirurgie, radiochirurgie, curiethérapie, chimiothérapie intra-tumorale), bien que pouvant contribuer à un plan de traitement global en exerçant une certaine cytoréduction, ne représenteront donc jamais la solution ultime au traitement de ces lésions.

Bien que la plupart des intervenants s'entendent sur le fait qu'une chirurgie optimale profite au patient, en diminuant l'effet de masse et la demande en corticoïdes, et en augmentant la tolérance aux différentes stratégies adjuvantes, l'apport de la chirurgie dite de cytoréduction demeure un concept hautement controversé. Le concept de chirurgie cytoréductive dans le contexte précis de tumeur cérébrale primaire maligne n'a jamais été démontré, et selon certains investigateurs, ne pourra jamais être démontré quant à son impact sur la survie des patients (Apuzzo, 1997).

La radiothérapie, considérée comme un standard de traitement suite à des études menées au début des années 1970, a évolué du point de vue technique de manière à réduire la neurotoxicité produite. Cependant, ces améliorations techniques ne se sont pas traduites par une amélioration dans les divers paramètres de survie (Fortin *et al.*, 1999).

La chimiothérapie conventionnelle en contexte de récidive et en contexte adjuvant a fait l'objet de nombreuses études cliniques. La percée la plus importante a consisté en l'identification de la chimio-sensibilité des oligodendrogliomes par Cairncross et Macdonald (1988). Cependant, la contribution de la chimiothérapie dans le traitement des tumeurs astrocytaires malignes demeure marginale. Certains auteurs affirment même que les patients porteurs de lésions astrocytaires malignes devraient se voir offrir des traitements de nature expérimentale dans un contexte d'étude clinique bien conçue, plutôt que des traitements de chimiothérapie standard, dont la valeur demeure douteuse après plusieurs décades d'expérimentation clinique (Holsi *et al.*, 1998).

Classiquement, on attribue le peu de succès de la chimiothérapie dans le traitement de ces tumeurs à deux facteurs : le passage inadéquat des agents thérapeutiques au-delà de la barrière hémato-encéphalique, et la résistance intrin-

sèque des cellules gliales néoplasiques aux agents de chimiothérapie.

L'existence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) a été démontrée par Ehrlich en 1906 qui, le premier, suspecta son existence à la suite d'expérimentations avec des colorants intra-veineux qui possédaient la capacité de marquer tous les tissus humains, à l'exception du cerveau (Ehrlich, 1906). Plusieurs chercheurs dans les années 1960 ont finalement établi que les jonctions serrées entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (et l'absence de fenestration) formaient la base anatomique de la barrière (Fortin et Neuwelt, 2002). Depuis, plusieurs autres particularités morphologiques contribuant à la fonction de la barrière ont été identifiées : projections podocytaires astrocytaires, charge nette négative endoluminale de la lame basale, présence de transporteurs protéiques spécifiques, absence de transport par endocytose, et absence relative de vésicules pinocytiques (Kroll et Neuwelt, 1998). Seules les substances liposolubles et ayant un poids moléculaire inférieur à 400-600 Dalton parviennent à traverser cette barrière hautement sélective, lorsque cette dernière est intacte (Kroll et Neuwelt, 1998).

Il est admis que la barrière est souvent altérée au pourtour des lésions astrocytaires de haut grade. Cependant, elle l'est de façon inconstante, incomplète et avec une topographie hétérogène ; ainsi des cellules tumorales viables peuvent exister à distance de la barrière anormale. Dans ces régions à distance du nodule prenant le contraste, la barrière est intacte, et les cellules néoplasiques sont donc protégées de la chimiothérapie (Fortin et Neuwelt, 2002).

Il est intéressant de constater que malgré la documentation disponible sur les conséquences pharmacodynamiques de la BHE dans le traitement des lésions gliales malignes, le domaine de recherche se vouant à l'étude du transport de molécules au sein du système nerveux central est négligé, et cet aspect n'est que rarement discuté dans les congrès de neuro-oncologie (Pardridge, 2002). De plus, certaines molécules thérapeutiques sont à l'étude sans que l'on ne considère l'aspect de leur transport au-delà de la BHE. De nombreuses études cliniques ont été menées avec des molécules dont le transport au sein du système nerveux central est négligeable de par leurs caractéristiques pharmacodynamiques (paclitaxel, étoposide).

Plusieurs stratégies sont actuellement considérées dans l'optimisation de l'acheminement de molécules thérapeutiques au sein du système nerveux central. Cependant, peu de stratégies ont été aussi documentées et étudiées, en modèle animal tout comme en clinique, que l'ouverture osmotique de la BHE. Le présent travail se veut une revue de la littérature existante sur le sujet, et un résumé des travaux accomplis par notre équipe à ce jour.

EXPÉRIMENTATION PRÉ-CLINIQUE

Rapport *et al.* (1972) furent les premiers à démontrer qu'une perfusion intra-artérielle de substance hyperosmolaire

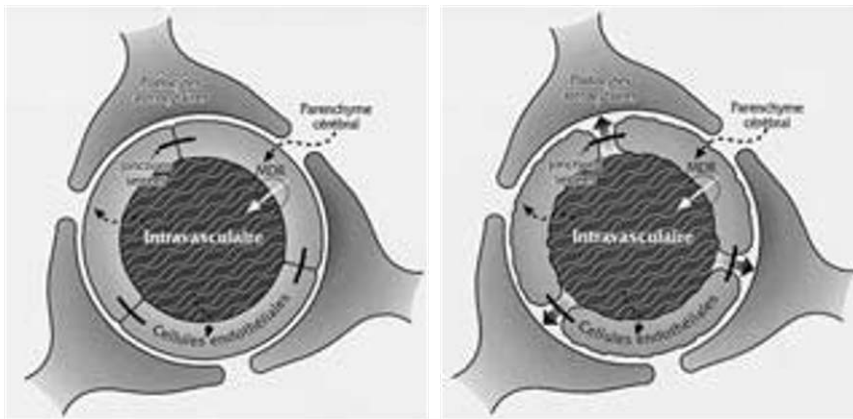


Fig. 1. — Mécanisme physiologique supposé produisant l'augmentation transitoire de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique : a) situation physiologique normale ; b) effondrement des cellules endothéliales produisant une ouverture physique des jonctions serrées à la suite de la perfusion intra-artérielle de mannitol.

Presumed physiological basis for the blood-brain barrier procedure: a) normal anatomic situation of a cerebral capillary in transverse view; b) osmotic shrinking of the endothelial cells producing a physical opening of the tight junctions after intra-arterial mannitol infusion.

produisait une altération réversible de la barrière. En utilisant le « bleu de Evans » comme marqueur de la perméabilisation, ce groupe a établi que l'injection d'une solution d'une molalité d'au moins 1,6 était nécessaire pour produire cette altération. Ce marqueur possède un poids moléculaire de 68 500 Dalton et, se liant à l'albumine à la suite de son injection intraveineuse, ne traverse normalement pas la BHE. Le temps d'exposition des cellules endothéliales à cette solution est un des facteurs critiques dans la production de l'effet de perméabilisation. Bien que 20 secondes représentent probablement le temps de perfusion minimum pour produire l'effet palier d'ouverture de la BHE, la majorité des auteurs s'accordent sur 30 secondes comme temps de perfusion optimal (Neuwelt, 1989). Différentes solutions de perfusion ont été utilisées dans l'élaboration de cette stratégie (mannitol arabinose, lactamide, solution saline, urée, et différents produits de contraste iodés). Pour des raisons pratiques, le mannitol est rapidement devenu l'agent de choix en application pré-clinique, ainsi qu'en application clinique.

En utilisant cet agent, Dorovini-zis *et al.* (1984) ont démontré l'ouverture physique des jonctions serrées par microscopie électronique dans une préparation bi-planaire de cellules endothéliales cérébrales servant de modèle de BHE. Brightman *et al.* (1973) ont démontré l'ouverture des jonctions serrées chez plusieurs espèces animales après perfusion intra-carotidienne de mannitol. De ces observations, il fut estimé que le mécanisme produisant la perméabilisation de la BHE était en partie attribuable à l'appel osmotique causé par l'exposition des cellules endothéliales au mannitol, et à l'effondrement de la paroi des cellules produisant une ouverture structurelle des jonctions serrées (Fig. 1). Ce phénomène n'est probablement pas le seul responsable du processus de perméabilisation, et d'autres mécanismes ont été aussi identifiés, en particulier une inhibition temporaire du métabolisme calcique intracellulaire et de l'activité Na,K-ATPase (Fortin *et al.*, 2000a). À tout événement, le phénomène de perméabilisation est transitoire, maximal 5 minutes après la perfusion de mannitol, et durant en moyenne de 20 minutes à 2 heures.

Comme l'osmolalité de la solution est connue et constante (mannitol), et le temps d'exposition optimal des cellules endothéliales à la solution osmotique a été identifié à 30 secondes, seul le débit d'infusion demeure variable et à ajuster pour chaque espèce animale. En effet, si le débit de perfusion est insuffisant, la solution hyperosmolaire ne remplacera pas le volume sanguin dans la distribution vasculaire traitée, et le mélange sang-mannitol produira une dilution de la solution hyperosmolaire, une baisse de l'osmolalité et une diminution de l'effet perméabilisant. Le débit doit donc être ajusté dans l'optique de remplir le territoire vasculaire choisi, sans toutefois produire un reflux excessif au sein du vaisseau parent susceptible d'entraîner des complications cardio-respiratoires (Fortin et Neuwelt, 2002). En effet, dans plusieurs modèles animaux, une infusion à débit excessif cause une surcharge liquidienne, et peut aussi produire, dans les minutes qui suivent l'infusion, un œdème pulmonaire aigu entraînant le décès (Fortin *et al.*, 2000b).

De plus, comme le débit de perfusion est grandement influencé par les paramètres cardiovasculaires, il devra idéalement être ajusté pour chaque individu d'une même espèce. Le choix de l'agent anesthésique sera aussi déterminant dans le degré de perméabilisation (Gummerlock et Neuwelt, 1990). En effet, plusieurs paramètres physiologiques auront une influence directe sur le degré d'ouverture de la BHE : la pression artérielle, le rythme cardiaque, la pression en CO₂ artérielle et le choix de l'agent anesthésique (comme variable indépendante supplémentaire à son impact direct sur les variables préalablement énumérées) (Remsen *et al.*, 1999). L'agent anesthésique traditionnellement utilisé dans la majorité des modèles était l'isoflurane, pour sa capacité à minimiser la vasodilatation cérébrale par rapport à d'autres agents volatiles halogénés (Fortin *et al.*, 2000). Cependant, le degré et la constance des ouvertures de BHE ainsi obtenues variaient grandement. La recherche d'agents produisant des réponses plus uniformes a conduit à l'utilisation du propofol. Le degré d'ouverture ainsi obtenu est passé à 95 p. 100 avec cette molécule (Remsen *et al.* 1999). Cependant, en parallèle à cette augmentation, une neurotoxicité

accrue a aussi été observée avec certaines combinaisons d'agents (Fortin *et al.*, 2000).

Pour notre part, afin de limiter les coûts et la complexité du modèle animal avec lequel nous travaillons, nous avons modifié le modèle initial proposé par Neuwelt *et al.* (1989). Le modèle traditionnel implique, après anesthésie générale, la dissection du cou et l'identification du complexe carotidien ; l'isolement et la section de la carotide externe ; la cannulation de ce vaisseau à l'aide d'un cathéter, et le positionnement du cathéter à environ 5 millimètres de la bifurcation carotidienne ; finalement, la perfusion du mannitol, suivi de l'infusion de la solution thérapeutique. Afin de nous permettre de négliger les effets délétères de certains agents anesthésiques sur la cardiodynamie, nous procédons, au préalable à la perfusion de mannitol, à l'installation d'un clip vasculaire au niveau de la carotide commune, prévenant ainsi toute possibilité de créer un reflux important au niveau de ce vaisseau (Fig. 2). En utilisant cette modification, notre laboratoire obtient des taux de perméabilisation aussi intéressants, sans morbidité et neurotoxicité accrue, et avec un modèle plus simple et moins dispendieux (Fortin *et al.*, 2004).

Tel que stipulé précédemment, le bleu de Evans est traditionnellement utilisé comme marqueur dans l'évaluation du degré d'ouverture de la BHE. Il permet de caractériser post-mortem le degré d'ouverture obtenu dans différents modèles animaux grâce à une échelle de classification qualitative (Fig. 3) (Neuwelt, 1989). Cependant, cette méthode qualitative a été critiquée par le fait de son imprécision (Rock, 2000). Une autre méthode utilisée dans la quantification du degré de perméabilisation consiste à perfuser une solution de ^{14}C -sucrose après l'ouverture de la BHE. Le cerveau est par la suite recueilli et homogénéisé en solution, avant d'être soumis à une lecture de décompte de scintillation (Bhattacharjee *et al.*, 2001). La plus grande faiblesse de cette technique réside dans l'impossibilité d'étudier la topographie dans le processus de perméabilisation.

Dans le but de pallier ces faiblesses, mais aussi dans le but d'améliorer nos connaissances quant aux mécanismes de base régissant les principes de la procédure, nous utilisons une technique de marquage à l'albumine par



Fig. 2. – Exposition chirurgicale du complexe carotidien chez le rat. Un clip chirurgical (tête de flèche noire) est appliqué sur la carotide commune (tête de flèche blanche) au préalable à la perfusion du mannitol. Un cathéter PE50 (double flèche) est utilisé afin de cannuler à rebours la carotide externe pour permettre par la suite la perfusion rétrograde de mannitol dans la carotide interne (simple flèche) afin de produire l'ouverture osmotique de la barrière hémato-encéphalique.

Surgical dissection of the right carotid artery complex in the rat, demonstrating the application of a temporary vascular clip (black arrow head) to the right common carotid artery (white arrow head). A PE-50 intramedic catheter (double arrow) cannulates the external carotid artery allowing infusion of mannitol in a retrograde fashion into the internal carotid artery (single arrow) to produce osmotic disruption of the blood-brain barrier.

immunohistochimie immunogold nous permettant aussi d'étudier en microscopie électronique la distribution de l'albumine marquée à l'or au pourtour des capillaires ayant été exposés à une ouverture osmotique. Dans un premier temps, la coloration immunohistochimique nous permet d'étudier sur des coupes coronales de cerveaux la distribution générale du marquage (Fig. 4). Nous sommes, de plus, en mesure de procéder à une quantification en exerçant une analyse d'image après digitalisation de la coupe. Un décompte de pixels ayant des caractéristiques différentes des pixels gisant en arrière plan est ainsi exprimé en pourcentage. L'hémisphère contralatéral est utilisé

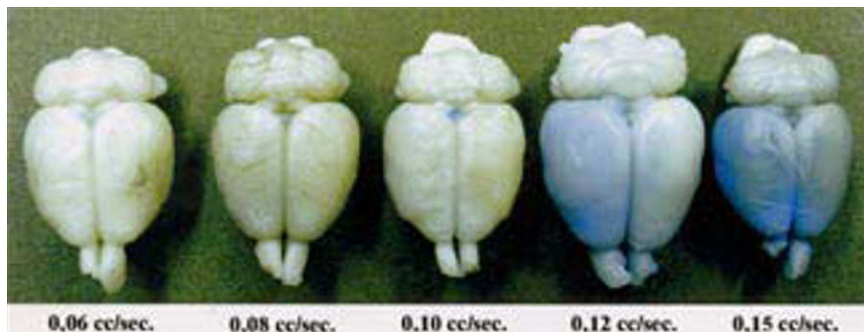


Fig. 3. – Coloration séquentielle de l'hémisphère droit dans une série de rats Fischer perfusés avec une solution intraveineuse de bleu de Evans au préalable à la procédure d'ouverture de la barrière hémato-encéphalique. Les animaux ont été exposés au traitement selon la technique décrite à la figure 2 en variant le débit d'infusion dans le but d'identifier le débit optimal produisant une perméabilisation de la barrière jugée adéquate. 0,12 ml/s est ici jugé optimal.

Sequential discoloration of the right hemisphere in a series of Fischer rats infused with i.v Evans blue and treated with BBBB according to our modified model. 0,12 ml/s has been identified as the optimal infusion rate.

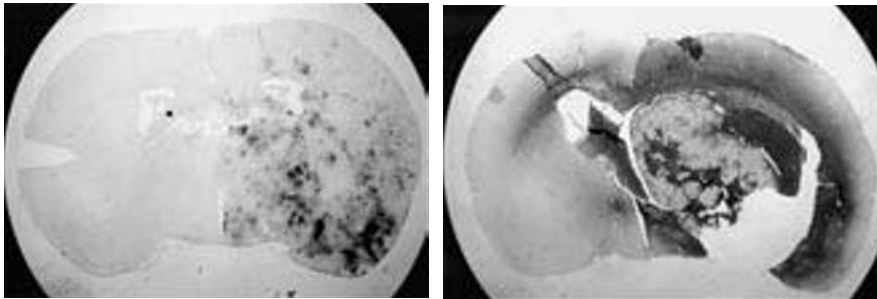


Fig. 4. – Coupes coronales d'échantillons de cerveaux de rats Fischer exposés à la procédure de perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique selon le modèle décrit à la figure 2. Un marquage immunohistochimique à l'albumine a été effectué et se présente sous la forme d'une décoloration foncée dans l'hémisphère traité (droit). a) Procédure effectuée à un débit d'infusion de 0,8 ml/s chez un rat Fischer normal. La topographie de l'immunomarquage démontre une hétérogénéité mar-

quée dans le processus de perméabilisation capillaire. b) Procédure effectuée à un débit d'infusion de 0,12 ml/s chez un rat Fischer implanté d'une tumeur F98, 20 jours plus tôt. Nous notons un immunomarquage intense au pourtour de cette lésion.

Coronal samples of Fischer rat brain exposed to BBBB with our modified model. Albumin immunohistochemistry illustrated by the black discoloration in the right hemisphere. a) BBBB procedure at 0,8 ml/s in a normal Fischer brain. The difference in staining intensity can be noted, as well as the topographic heterogeneity in capillary leaking. b) BBBB procedure at 0,12 ml/s in a F98 tumor-bearing Fischer rat, 20 days after the implantation. Marked increase in permeability in the right hemisphere around the tumor.

comme contrôle de normalisation de l'image, pour éviter toute variation attribuable à la technique de coloration entre les différents spécimens. Nous sommes en cours de validation de cette approche, en vue de considérer l'intensité de marquage (comme indice du degré d'ouverture de la BHE, et donc, du degré d'acheminement d'une molécule thérapeutique) comme variable prospective à étudier dans les prochains essais thérapeutiques animaux.

Par ailleurs, en microscopie électronique, nous cherchons à étudier le transit de l'albumine marquée au pourtour des capillaires cérébraux exposés à la procédure de perméabilisation afin de déterminer si les molécules passent par des jonctions serrées physiquement ouvertes (ce que croient la majorité des auteurs) ou si elles circulent par les cellules endothéliales temporairement inactivées (Fig. 5).

EXPÉRIMENTATION CLINIQUE

Au final, toute ces études pré-cliniques ont pour but de faire bénéficier les patients d'approches thérapeutiques novatrices qui soient sûres et efficaces. L'expérimentation clinique avec ce type de stratégie a débuté à la fin des années 1980 (Kroll et Neuwelt, 1998). Cependant, nous avons dû attendre 1995 pour voir naître un effort concerté de la recherche clinique permettant un cumul de données systématiques dans le cadre d'études phase II. Ainsi, plus de 300 patients, ayant été exposés à plus de 3 000 procédures ont été enregistrés dans la banque de donnée de « l'International Blood-Brain Barrier Consortium », un organisme d'étude multicentrique sur la technique d'ouverture osmotique de la BHE comprenant 7 centres universitaires.

Le « Blood-Brain Barrier Consortium » a montré que grâce à l'utilisation de lignes de conduites et de protocoles standards, la chimiothérapie intra-artérielle rehaussée de l'ouverture osmotique de la BHE était réalisable avec un taux de complication limité (Doolittle *et al.*, 2000). Ces conclusions abondaient dans le sens de Cloughesy *et al.* (1997) qui soutenaient qu'en appliquant les techniques

d'angiographie moderne, incluant des vérifications fréquentes de la position du cathéter, la chimiothérapie intra-artérielle était maintenant une technique sûre. Ce constat allait cependant à l'encontre des conclusions de Mortimer *et al.* (1992), qui considéraient impossible l'utilisation multicentrique de procédures de chimiothérapie intra-artérielle en raison du haut taux de complications recensées dans leur étude.

Notre expérience locale au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke est en accord avec les données publiées par le Consortium. En effet, nous avons noté une faible incidence de complications dues à la technique de cathétérisme. Quatre patients ont présenté une complication majeure (thrombose du vaisseau canulé) en 527 procédures, entraînant un taux de complications majeures par geste de 0,8 p. 100. Ces complications se sont produites chez des patients ayant présenté des spasmes artériels secondaires à l'insertion du cathéter, non complètement résolus au moment de la perfusion de mannitol à haut débit ; une situation que nous évitons maintenant en supprimant la perfusion de mannitol dans les cas de spasme résiduel. Nous n'avons pas observé de nouvelles complications de ce genre depuis. Le *Tableau I* présente la liste détaillée des complications recensées dans la série Sherbrookoise.

Les données du consortium, de même que les données Sherbrookoises, nous permettent de soutenir le concept voulant que cette approche soit sûre, lorsqu'elle est effectuée dans un contexte standardisé. Attardons-nous à présent sur l'analyse des résultats obtenus afin d'en étudier l'efficacité. Mais d'abord, la procédure clinique sera décrite en détail.

PROCÉDURE CLINIQUE DE PERMÉABILISATION DE LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE

La procédure d'ouverture osmotique de la BHE débute par l'anesthésie générale du patient. En effet, l'intervention peut produire une instabilité hémodynamique lors de la

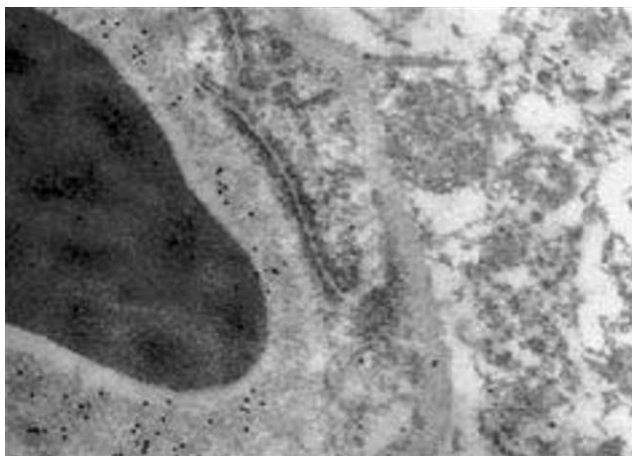


Fig. 5. – Microscopie électronique à la périphérie d'un capillaire cérébral chez un rat Fischer implanté d'une tumeur cérébrale. La technique de marquage à « l'immuno-gold » a été utilisée ici. Les décolorations ponctiformes représentent les particules d'or liées à l'albumine. Certaines de ces particules sont retrouvées au-delà de la membrane basale de la cellule endothéliale cérébrale, dans le parenchyme cérébral péri-tumoral. Nous souhaiterions développer cette technique pour explorer et caractériser plus précisément la physiologie de la procédure d'ouverture de la BHE (courtoisie du Dr. Ana Maria Tsanaclis).

Electron microscopy performed at the periphery of a cerebral capillary in a tumor-implanted Fischer rat. The immuno-gold staining technique was used here to stain albumin (black particles). In this sample, some of the particles can be seen at the periphery of the endothelial cell, in brain parenchyma surrounding the tumor. We intend to use this approach in the future in our attempts to characterize the physiology of the BBB procedure.

perfusion du mannitol (bradycardie, hypertension artérielle), ainsi que des crises convulsives durant l'administration de la chimiothérapie, des événements plus facilement et rapidement corrigés lorsque le patient est sous anesthésie générale. L'intervention produit également une hypertension intracrânienne modérée pour une période transitoire d'environ 20 minutes. Une cérébro-protection est donc administrée au patient sous forme de barbituriques à haute dose avant la perfusion de mannitol (Fortin et Neuwelt, 2002).

Par la suite, le radiologue interventionnel procède à la mise en place d'un cathéter intra-artériel dans le vaisseau responsable de la majorité de l'irrigation tumorale (carotide interne gauche ou droite, vertébrale dominante). De toute évidence, le choix du vaisseau est entièrement dépendant de la localisation de la lésion. Par l'intermédiaire de ce cathéter intra-artériel, on procède ensuite à l'ouverture proprement dite de la BHE par la perfusion de mannitol 25 p. 100, après avoir déterminé le rythme de perfusion de ce dernier pour remplir complètement l'arbre vasculaire du territoire donné pendant 30 secondes et en évitant toutefois un reflux rétrograde excessif.

Tableau I. – Complications recensées en 527 procédures. *Complications noted in 527 procedures.*

Complications	Nombre d'événements	Pourcentage d'événements
Thrombose de la carotide droite et cécité de l'œil droit	1	0,2
Thrombose carotidienne produisant un déficit transitoire et récupération symptomatique complète	3	0,6
Dissection sous-endothéliale asymptomatique	2	0,4
Pseudotumeur orbitaire ipsilatérale	3	0,6
Réaction allergique au carboplatine	1	0,2
Convulsions pendant la procédure		8
Convulsions retardées (12 h) avec déficit post-ictal prolongé	18	3,4
Neutropénie fébrile	2	0,4
Thrombocytopenie nécessitant transfusion	2	0,4

Une fois l'administration de mannitol terminée, la position du cathéter, de même que l'absence d'atteinte endothéliale sont vérifiées. Puis, la chimiothérapie intra-artérielle est administrée par ce même cathéter, à un débit de perfusion et une dilution pré-sélectionnés afin d'éviter le phénomène du « *streaming* » impliquant un mauvais mélange de deux solutions en phase liquide (Saris *et al.*, 1991).

Après l'ouverture osmotique de la BHE, l'administration intra-artérielle d'un agent de chimiothérapie en amplifie le passage en l'augmentant par un facteur pouvant atteindre 100 fois le passage obtenu par une administration intraveineuse standard du même agent (Neuwelt *et al.*, 1989). Cette augmentation est de moindre degré si la perfusion de l'agent de chimiothérapie est effectuée en intraveineux, après l'ouverture osmotique : on constate alors une augmentation allant de 7 à 10 fois la dose mesurée par rapport à une administration intraveineuse standard (Neuwelt *et al.*, 1989).

La durée de l'augmentation de la perméabilité de la barrière a été estimée à environ 60 à 120 minutes en contexte clinique, mais est optimale dans les 20 premières minutes suivant la perfusion du mannitol (Neuwelt, 1989). Dans le but d'estimer le degré d'ouverture de la BHE obtenu lors de chaque session de traitement, un produit de contraste iodé peut être perfusé en intraveineux 5 minutes suivant l'administration de mannitol. L'image ainsi obtenue (Fig. 6) est utilisée pour estimer le degré d'ouverture produit en fonction d'une échelle visuelle hautement reproductible (Roman-Goldstein *et al.*, 1994). Par la suite, un personnel spécialement formé assure une surveillance



Fig. 6. — Scanner X cérébral, coupe axiale, avec injection IV de contraste iodé obtenu 20 minutes après la procédure d'ouverture de la BHE chez une patiente de 69 ans souffrant d'un lymphome primaire du système nerveux central. La perméabilisation de la BHE est démontrée par le rehaussement diffus de l'hémisphère cérébral droit, principalement au niveau des régions corticales.

An iodinated contrast-enhanced CT scan obtained 20 minutes after BBBB in the right hemisphere of a 69-year-old patient bearing a primary CNS lymphoma. Beside the uptake of iodinated contrast material in the right hemisphere, notice the bright enhancement in the tumor nodule.

étroite des patients dans les premières heures suivant la procédure, tout d'abord en salle de réveil et par la suite dans le service des soins intensifs intermédiaires des sciences neurologiques.

RÉSULTATS CLINIQUES

Différents types tumoraux ont été traités par cette approche. McAllister *et al.* (2000) ont rapporté les résultats obtenus dans le traitement des lymphomes du système nerveux central, une entité notoirement chimiosensible, mais rarement curable par chimiothérapie isolée. Les patients de cette série ont été traités par un protocole de perméabilisation osmotique de la BHE, combiné à un protocole de chimiothérapie alliant méthotrexate intra-artériel, étoposide et cyclophosphamide intraveineux. La survie médiane fut de 41 mois et la survie à 5 ans de 42 p. 100 ; de surcroît, ce groupe démontra que cette modalité de traitement ne produisait pas d'atteintes neuro-cognitives chez les survivants à long terme. Ces résultats furent obtenus sans consolidation radiothérapique et se comparaient donc favorablement à la fréquence des atteintes neuro-cognitives après l'utilisation de la combinaison méthotrexate/radiothérapie dans le traitement du lymphome du système nerveux central (Abrey *et al.*, 1998).

Par ailleurs, et dans une analyse ultérieure de ces données, Kraemer *et al.* (2001) ont démontré une relation statistique entre l'intensité de dose de méthotrexate et la probabilité de survie. Pour ce faire, ces auteurs ont créé un indice composite estimé en tenant compte du nombre de cycles et du grade radiologique d'ouverture osmotique de la BHE obtenu lors de chaque cycle de traitement (tel que décrit plus haut). L'analyse a été suivie par une série de tests statistiques visant à éliminer les différents biais, dont celui de la survie. Malgré l'élimination graduelle de ces biais, la relation entre l'intensité de la dose administrée et la survie demeurait. Il s'agit d'un premier argument en faveur de l'importance de l'intensité de la dose dans le pronostic de patients traités pour des pathologies néoplasiques du système nerveux central par chimiothérapie.

À ce jour, nous n'avons traité que 8 patients porteurs d'un lymphome primitif du système nerveux central (n = 6) et d'un lymphome systémique avec métastases cérébrales (n = 2) à Sherbrooke. Ces patients ont obtenu le taux de réponse radiologique le plus important de notre série selon les critères de Macdonald, avec 6 réponses complètes et 2 réponses partielles. Ce résultat n'est pas surprenant, étant donnée la chimiosensibilité notoire de ces tumeurs. Il est intéressant de constater que la médiane n'a pas été atteinte, et que la survie moyenne à partir du diagnostic était de 139 semaines. Il importe aussi de mentionner que ces patients n'ont pas été exposés à la radiothérapie, et ne souffriraient donc pas des effets délétères de cette modalité de traitement sur les fonctions cognitives (Crossen *et al.*, 1994).

Mais qu'en est-il des autres types histologiques ? Nous centrerons la suite de la discussion sur les résultats obtenus dans le cadre d'une étude phase II en cours à Sherbrooke et regroupant différents types tumoraux (*Tableau II*) : lésions astrocytaires malignes, lésions oligodendrogiales et lésions métastatiques.

Il va de soi que les résultats obtenus dans le traitement des astrocytomes malins sont hautement dépendants du protocole de chimiothérapie sélectionné. À ce jour, l'expérience est relativement limitée et concerne pour l'essentiel un seul protocole à base de carboplatine et d'étoposide. Le carboplatine a démontré son efficacité dans le traitement des tumeurs astrocytaires à la suite de plusieurs études cliniques (Yung *et al.*, 1991 ; Huncharek et Muscat, 1998). De plus, cet agent, nettement moins toxique pour les nerfs périphériques que le cisplatine, possède un profil d'inocuité compatible avec l'administration intra-artérielle (Go *et al.*, 1999). Cet aspect est primordial, car la neurotoxicité d'un agent est augmentée en maximisant son passage au sein du système nerveux central par la procédure de perméabilisation de la BHE (Fortin *et al.*, 2000). De fait, la chimiothérapie intra-artérielle à base de nitroso-urée a été tentée dans le passé, et jugée trop toxique par rapport aux bénéfices retrouvés (Shapiro *et al.*, 1992). Le passage accru de BCNU fut associé à une neurotoxicité importante, sous forme d'encéphalopathie irréversible (10 p.100 des patients) et de cécité monoculaire, ipsilatérale à l'infusion

intra-artérielle (15 p. 100 des patients) (Shapiro *et al.*, 1992). L'utilisation de cette molécule, dans le cadre de perméabilisation osmotique de la BHE serait, sans nul doute, plus toxique que sa simple perfusion intra-artérielle (Fortin *et al.*, 2000).

Un examen des différentes populations de patients ayant bénéficié des procédures de perméabilisation de la barrière à Sherbrooke à ce jour nous permet de constater que les lésions gliales astrocytaires malignes constituent la majorité des lésions traitées au moment de la compilation des données (n = 31) (Tableau II). Ces patients ont reçu un protocole modifié par rapport à celui utilisé par l'« *International Blood Brain Barrier Consortium* ». Notre approche combinait une procédure de perméabilisation de la BHE à une perfusion unique de carboplatine par voie intra-artérielle (400 mg/m²), une perfusion intra-veineuse d'étoposide (400 mg/m²) et de cyclophosphamide (330 mg/m²). Le cyclophosphamide fut administré préalablement à la perméabilisation de la BHE, car cet agent requiert une activation hépatique pour être effectif.

Parmi les patients porteurs d'astrocytomes malins (grade III et IV, WHO) (n = 31), deux patients (6 p. 100) ont obtenu une réponse complète, 16 patients (52 p. 100) une réponse partielle et 12 (39 p. 100) une stabilisation de la maladie selon les critères de Macdonald (1990). Pour ces patients, une survie médiane de 196 semaines a été obtenue.

Par ailleurs, les données concernant les patients porteurs de glioblastomes multiformes ont été analysées séparément par soucis de clarté (n = 20). Ainsi, un intervalle médian libre de progression de 17 semaines et un intervalle médian de survie à partir du diagnostic de 138 semaines furent rapportés pour ce groupe. Ces données sont encourageantes si l'on se réfère à la médiane de survie de ces patients qui est habituellement de 39 à 52 semaines (Huncharek et Muscat,

1998). Le score fonctionnel de Karnovsky moyen des patients traités dans cette série était de 63. L'âge moyen était de 48 ans, et le groupe se composait de 15 hommes et 5 femmes, montrant qu'il ne s'agissait pas d'une population particulièrement sélectionnée.

Bien qu'utilisant la même procédure de perméabilisation de la BHE, mais avec un protocole de chimiothérapie différent, nos résultats sont nettement plus encourageants que ceux publiés par Kraemer *et al.* (2002). Ce groupe rapportait une médiane de survie d'environ 90 semaines dans une série de 41 patients porteurs d'astrocytomes malins (20 patients grade III et 21 grade IV du WHO).

Les raisons expliquant cette disparité dans les résultats sont potentiellement multiples. Bien qu'il soit indéniable que des biais de sélection peuvent expliquer en partie la différence entre les deux séries, la modification effectuée au protocole de traitement par notre équipe demeure la différence la plus significative. En effet, pour des raisons logistiques, notre protocole délivrait une perfusion unique de carboplatine de 400 mg/m² pour un seul territoire vasculaire traité par cycle, alors que deux traitements consécutifs de 200 mg/m² dans deux territoires vasculaires différents à 24 heures d'intervalle pour le protocole étaient utilisés par Kraemer *et al.* Cette seule différence pourrait à nos yeux influencer l'efficacité de la procédure. En effet, notre approche favorise l'augmentation de la concentration de chimiothérapie dans une région vasculaire donnée, au détriment du nombre de territoires perméabilisés. Ceci aurait pour effet d'augmenter l'aire sous la courbe et potentiellement de maximiser l'exposition des cellules néoplasiques à la chimiothérapie. Ceci au dépend d'un territoire perméabilisé plus restreint toutefois.

Ces résultats nous ont encouragés à développer une étude randomisée qui évaluera l'altération du métabolisme cérébral par des études de tomographie par émission de positron avec le 18-fluorodéoxyglucose chez des patients porteurs d'un glioblastome multiforme suite à une chimiothérapie intra-artérielle combinée avec ou sans ouverture osmotique de la barrière hémato-encéphalique et des patients exposés à des modalités de radiothérapie seule.

Par ailleurs, les résultats obtenus dans le traitement des autres groupes histologiques s'avèrent tout aussi encourageant. À noter que la grande majorité des patients présentés avaient déjà bénéficié d'autres modalités thérapeutiques (radiothérapie 64 p. 100, chimiothérapie 47 p. 100, chimiothérapie et radiothérapie 40 p. 100, radiochirurgie 6 p. 100).

Pour le groupe des oligodendrogliomes anaplasiques (n = 17), 9 patients (53 p. 100) ont présenté une réponse partielle, et 6 (35 p. 100) ont vu la progression de leur maladie stabilisée. Un intervalle médian de progression de 39 semaines, et un intervalle médian de survie de 257 semaines ont été observés. Ces résultats sont quelques peu décevants, si l'on considère que ce type de tumeur solide est habituellement remarquablement chimiosensible (Cairncross et Macdonald, 1988). Nous devons évidemment prendre en considération le fait que bon nombre de ces patients (n = 9) avaient été lourdement pré-traités, ayant préalablement été exposés à différents protocoles de chimiothérapie, de même

Tableau II. – Types tumoraux.
Tumor types.

Type histologique	Nombre	Pourcentage
Astrocytomes malins	31	28
– glioblastome multiforme	20	
– astrocytome anaplasique	6	
– gangliogliome malin	1	
– gliome du tronc	1	
– gliome optique	1	
– xanthoastrocytome pléomorphe	1	
– gliosarcome		
Oligodendrogliome anaplasique	17	24
PNET	2	3
Lymphome primaire SNC	8	11
Lymphome secondaire SNC	4	6
Métastases	10	14
– sein	4	
– ovaire	4	
– testicules	1	
– poumon	4	

qu'à la radiothérapie. Notre protocole a donc littéralement servi de traitement de « sauvetage » chez ces patients, avec un intervalle libre de progression de 39 semaines.

Le groupe des lésions métastatiques constitue un groupe hétérogène regroupant différents types de maladies primaires (Tableau II). D'un groupe aussi disparate et de si petite taille (n = 10), il est difficile de tirer des conclusions fermes. Cependant, pour l'ensemble du groupe, une réponse partielle ou complète chez 7 des 10 patients a été observée, et une médiane de 14 et de 115 semaines a été recensée, respectivement pour l'intervalle de progression et de survie. Ces données se comparent avantageusement aux résultats obtenus par Antonadou *et al.* (2002) qui ont rapporté une survie médiane de 8,6 mois pour un groupe traité avec témozolomide et radiothérapie, comparativement à une survie médiane de 7 mois pour le groupe traité avec radiothérapie seule. Les sous-types histologiques que sont le carcinome ovarien et le carcinome pulmonaire à petite cellule se sont montrés particulièrement chimiosensibles. Le cumul de données se poursuit chez ce groupe de patients, avec un intérêt de plus en plus soutenu pour les résultats obtenus chez les patients atteints de tumeurs mentionnées ci-dessus.

CONCLUSION

La procédure de perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique est encore en développement. Les modalités optimales de traitement quant aux agents de chimiothérapie choisis, leurs cycles d'administration, ainsi que ceux des procédures de perméabilisation et le nombre total de cycle à administrer demeurent à déterminer dans de futurs essais thérapeutiques. Il importe de bien décomposer la problématique de l'acheminement d'une molécule et l'efficacité de cette dite molécule. Une fois la stratégie d'acheminement entièrement au point, les molécules les plus aptes à produire un effet thérapeutique, que ce soit des molécules traditionnelles (chimiothérapie) ou des nouvelles molécules, devront être testées en conjonction à la procédure de perméabilisation de la BHE. Déjà, différentes molécules empruntant un mécanisme d'action issu de l'explosion des connaissances en biologie moléculaire tracent leur chemin vers la clinique, et pourraient représenter des candidats intéressants dans le futur (Zlokovick et Apuzzo, 1997). De fait, certaines études ont démontré avec succès l'utilisation potentielle de la méthode de perméabilisation osmotique de la BHE pour acheminer des molécules de thérapie génique (Muldoon *et al.*, 1995), des anticorps monoclonaux (Neuwelt *et al.*, 1988) et des dérivés boronophénylanine dans la thérapie de capture de neutron (Yang *et al.*, 1996).

Dans un éditorial récent, Pardridge (2002) décrivait son étonnement devant l'absence de discussion et d'intérêt pour l'acheminement des molécules thérapeutiques au-delà de la BHE dans le traitement des pathologies du système nerveux central. En effet, l'efficacité thérapeutique d'une molécule

implique que cette molécule atteigne dans un premier temps sa cible en concentration suffisante. De nombreux agents ayant une pénétration pratiquement nulle (étoposide, paclitaxel) ont fait l'objet d'études cliniques dans le traitement des tumeurs cérébrales avec des résultats décevants. L'acheminement inadéquat de ces molécules au cerveau est potentiellement responsable, au moins en grande partie, du peu de succès obtenu.

Les différents mécanismes de la BHE, incluant le produit du gène MDR, représentent un obstacle de taille à cet objectif qu'est la livraison intégrale d'une molécule à sa cible au sein du système nerveux central. L'acheminement des molécules thérapeutiques est une thématique de plus en plus reconnue et discutée. Grâce aux efforts concertés de groupes s'intéressant à cette problématique, nos connaissances s'accroissent de manière exponentielle, et différentes stratégies permettant de contourner cette barrière ont été conçues et sont testées au laboratoire et en clinique, afin d'en démontrer l'implication clinique. Les efforts doivent se poursuivre en ce sens. La communauté neuro-scientifique ne peut se permettre d'ignorer plus longtemps cet aspect.

RÉFÉRENCES

- ABREY LE, DEANGELIS LM, YAHALOM J. (1998). Long term survival in primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol*, 16: 859-863.
- ANTONADOU D, PARASKEVAIDIS M, SARRIS G, COLIARAKIS N, ECONOMOU I, KARAGEORGIS P, THROUVALAS N. (2002). Phase II randomized trial of temozolomide and concurrent radiotherapy in patients with brain metastases. *J Clin Oncol*, 17: 3644-3650.
- APUZZO MLJ. (1997). Quantitative imaging study of extent of surgical resection and prognosis of malignant astrocytomas (comment). *Neurosurgery*, 41: 1038.
- BHATTACHARJEE AK, NAGASHIMA T, KONDOH T, TAMAKI N. (2001). Quantification of early blood-brain barrier disruption by in situ brain perfusion technique. *Brain Res Prot*, 8: 126-131.
- BRIGHTMAN MW, HORI M, RAPOPORT SI, REESE TS, WESTERGAARD E. (1973). Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium. *J Comp Neurol*, 152: 317-325.
- CAIRCROSS JG, MACDONALD DR. (1988). Successful chemotherapy for recurrent malignant oligodendroglioma. *Ann Neurol*, 23: 460-464.
- CLOUGHESY TF, GOBIN YP, BLACK KL *et al.* (1997). Intraarterial carboplatin chemotherapy for brain tumors: a dose escalation study based on cerebral blood flow. *J Neuro Oncol*, 35: 121-131.
- CROSSEN JR, GARWOOD D, GALSTEIN E, NEUWELT EA. (1994). Neurobehavioral sequelae of cranial irradiation in adults: a review of radiation-induced encephalopathy. *J Clin Oncol*, 12: 627-642.
- DOOLITTLE ND, MINER ME, HALL WA *et al.* (2000). Safety and Efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors. *Cancer*, 88: 637-647.
- DOROVINI-ZIS K, BOWMAN PB, BETZ AL, GOLDSTEIN GW. (1984). Hyperosmotic arabinose solutions open tight junctions between brain capillary endothelial cells in tissue culture. *Brain Res*, 302: 383-386.
- EARNEST 4TH, KELLY PJ, SCHEITHAUER BW *et al.* (1988). Cerebral astrocytomas: histopathologic correlation of MR and CT contrast enhancement with stereotactic biopsy. *Radiology*, 166: 823-827.
- EHRlich P. (1906). *Über die Beziehungen von chemische Constitution, Vertheilung, und Pharmakologischer Wirkung: Collected Studies In Immunity.* John Wiley. New York: pp. 567-595.

- FORTIN D, ADAMS R, GALLES A. (2004). A blood-brain barrier disruption model eliminating the hemodynamic effect of ketamine. *Can J Neurol Sci*, 31: 248-253.
- FORTIN D, CAIRNCROSS GJ, HAMMOND RR. (1999). Oligodendroglioma: an appraisal of recent data pertaining to diagnosis and treatment. *Neurosurgery*, 45: 1279-1291.
- FORTIN D, McCORMICK CI, REMSEN LG, NIXON R, NEUWELT EA. (2000). Unexpected neurotoxicity of etoposide phosphate administered in combination with other chemotherapeutic agents after blood-brain barrier modification to enhance delivery, using propofol for general anesthesia, in a rat model. *Neurosurgery*, 47: 199-207.
- FORTIN D, NEUWELT EA. (2002). Therapeutic manipulation of the blood-brain barrier. Neurobase-neurosurgery. First edition. Medlink CD-ROM.
- FORTIN D, OSZTIE E, NEUWELT EA. (2000). Iatrogenic arterial spasm relieved by intraarterial mannitol infusion. *Am J Neuroradiol*, 21: 968-970.
- GO RS, ADJEI AA. (1999). Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol*, 17: 409-422.
- GUMMERLOCK MK, NEUWELT EA. (1990). The effects of anesthesia on osmotic blood-brain barrier disruption. *Neurosurgery*, 26: 268-277.
- HOLSI P, SAPPINO AP, DE TRIBOLET N, DIETRICH PY. (1998). Malignant glioma: should chemotherapy be overthrown by experimental treatments? *Ann Oncol*, 6: 589-600.
- HUNCHAREK M, MUSCAT J. (1998). Treatment of recurrent high grade astrocytoma; results of a systematic review of 1415 patients. *Anticancer Res*, 18: 1303-1312.
- KRAEMER DF, FORTIN D, DOOLITTLE ND, NEUWELT EA. (2001). Association of total dose intensity of chemotherapy in primary central nervous system lymphoma and survival. *Neurosurgery*, 48: 1033-1041.
- KRAEMER DF, FORTIN D, NEUWELT EA. (2002). Chemotherapeutic dose intensification for treatment of malignant brain tumors: recent developments and futures directions. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2: 216-224.
- KROLL RA, NEUWELT EA. (1998). Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery*, 42: 1083-1100.
- MACDONALD DR, CASCINO TL, SCHOLD SC JR, CAIRNCROSS JG. (1990). Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol*, 7: 1277-1280.
- McALLISTER LD, DOOLITTLE ND, GUASTADISEGNI PE, KRAEMER DF, LACY CA, CROSSEN JR, NEUWELT EA. (2000). Cognitive outcomes and long-term follow-up results after enhanced chemotherapy delivery for primary central nervous system lymphoma. *Neurosurgery*, 46: 51-61.
- MORTIMER JE, CROWLEY J, EYRE H, WEIDEN P, ELTRINGHAM J, STUCKEY WJ. (1992). A phase II randomized study comparing sequential and combined intraarterial Cisplatin and radiation therapy in primary brain tumors. *Cancer*, 69: 1220-1223.
- MULDOON LL, NILAVER G, KROLL RA *et al.* (1995). Comparison of intracerebral inoculation and osmotic blood-brain barrier disruption for delivery of adenovirus, herpesvirus, and iron oxide particles to normal rat brain. *Am J Pathol*, 147: 1840-1851.
- NEUWELT EA. (1989). Implications of the Blood-Brain Barrier and Its Manipulation. Vol. 1 and 2. *Plenum Press*. New York.
- NEUWELT EA, BARNETT PA, HELLSTRÖM I, HELLSTRÖM KE, BEAUMIER P, McCORMICK CI, WEIGEL RM. (1988). Delivery of melanoma-associated immunoglobulin monoclonal antibody and Fab fragments to normal brain utilizing osmotic blood-brain barrier disruption. *Cancer Res*, 48: 4725-4729.
- PARDRIDGE WM. (1997). Drug delivery to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17: 713-731.
- PARDRIDGE WM. (2002). Targeting neurotherapeutic agents through the blood-brain barrier. *Arch Neurol*, 59: 35-40.
- RAPOPORT SI, HORI M, KLATZO I. (1972). Testing of a hypothesis for osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am J Physiol*, 223: 323-331.
- REMSSEN LG, PAGEL MA, McCORMACK CI, FIAMENGO S, SEXTON G, NEUWELT EA. (1999). The influence of anesthetic choice, PaCO₂, and other factors on osmotic blood brain barrier disruption in rats with brain tumor xenografts. *Anesth Analg*, 88: 559-567.
- ROCK JP. (2000). Unexpected neurotoxicity of etoposide phosphate administered in combination with other chemotherapeutic agents after blood-brain barrier modification to enhance delivery, using propofol for general anesthesia, in a rat model (comment). *Neurosurgery*, 47: 207.
- ROMAN-GOLDSTEIN S, CLUNIE DA, STEVENS J, HOGAN R, MONARD J, RAMSEY F, NEUWELT EA. (1994). Osmotic Blood-Brain Barrier Disruption: CT and Radionuclide Imaging. *Am J Neuroradiol*, 15: 581-590.
- SARIS SC, BLASBERG RG, CARSON RE. (1991). Intravascular streaming during carotid infusion: demonstration in humans and reduction using diastole-phased pulsatile administration. *J Neurosurg*, 74: 763-772.
- SILBERGELD DL, CHICOINE MR. (1997). Isolation and characterization of human malignant glioma cells from histologically normal brain. *J Neurosurg*, 86: 525-531.
- SHAPIRO WR, GREEN SB, BURGER PC *et al.* (1992). A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma. *J Neurosurg*, 76: 772-781.
- YANG W, BARTH RF, CARPENTER DE, MOESCHBERGER ML, GOODMAN JH. (1996). Enhanced delivery of boronophenylalanine by means of intracarotid injection and blood-brain barrier disruption for neutron capture therapy. *Neurosurgery*, 38: 985-992.
- YUNG WKA, MECHTLER L, GLEASON MJ. (1991). Intravenous carboplatin for recurrent malignant glioma: a phase II study. *J Clin Oncol*, 9: 860-864.
- ZLOKOVIC BV, APUZZO ML. (1997). Cellular and molecular neurosurgery: pathways from concept to reality-part I: target disorders and concept approaches to gene therapy of the central nervous system. *Neurosurgery*, 40: 789-80.