

뇌 종양내 항암제 치료를 위한 항암제 방출용 생분해성 폴리머 개발 - 체외실험 결과

아주대학교 의과대학 신경외과학교실,¹ 아주대학교 신경과학기술과정,² 성균관대학교 고분자공학과³
 조윤철² · 조한진³ · 안정호³ · 이원정¹ · 윤수한¹

Development of Biodegradable Polymer Releasing Anticancer Drug for Intratumoral Chemotherapy of Brain Tumor-in Vitro Results

Yoon Chul Cho, B.S.,² Han Jin Cho, B.S.,³ Jeong Ho An, Ph.D.,³
 Won Chung Lee, R.N.,¹ Soo Han Yoon, M.D.¹

Department of Neurosurgery,¹ School of Medicine, Brain Disease Research Center,² Ajou University, Suwon, Korea
 Center for Advanced Functional Polymers,³ Department of Polymer Science & Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon, Korea

Objective : The authors present two polymers as carriers of anti-neoplastic agents for intratumoral chemotherapy. We investigated in vitro tumor cytotoxicity against C6 glioma cells with 20ul cis-platinum(CDDP)-polymer.

Methods : We firstly developed new two thermosensitive sol-gel reversible polymer(poly-2 and poly-6) by random copolymerization from ethylene glycol and caprolactone polymer that is sol state over 50°C but changed gradually to gel less than 50°C We evaluated the time-related release profiles of 10mg cisplatin from CDDP-Poly 2 and CDDP-Poly 6 in 25ml of pH 7.4 phosphate buffer saline using UV spectrophotometer during 31days. We cultured C6 glioma cell line in 10cm round plates for 2 days and added 20μl of CDDP-polymer containing 30uM of CDDP into the center of each plate. We counted C6 cell number every 12 hours for 72 hours at same 3 sites of each 6 well plates.

Results : UV spevtrophotometry showed total 12.6% of CDDP released from CDDP-poly2 and total 56.9% of CDDP from CDDP-poly6 on 31 days. Both carrier polymer showed total released amount of CDDP directly correlated with time without initial dumping effect. The CDDP released from 20μl of CDDP-poly2 and CDDP-poly6 in 48 hours showed cytotoxicity to C6 glioma cells more than 50% in vitro cell culture system.

Conclusion : This results suggest that less than 20μl CDDP-polymer could be applied in vivo brain tumor model to show significant cytotoxicity.

KEY WORDS : Chemotherapy · Polymer · Drug carrier · Glioma · Cisplatin .

서 론

뇌 교종의 치료는 수술, 방사선 치료와 항암제 치료 등 모든 치료를 시도하고 있음에도 불구하고 아직도 효과적이지 못하다. 전신적 항암제 투여는 종양 내 항암제 집중률과 혈뇌장벽 투과도가 낮으며^{12,22)}, 전신적 항암제 독성이 나타나고¹⁴⁾, 항암제가 종양에 노출되는 시간이 짧다는 등의 단점이 있어 이를 개선하기 위해 뇌종양 내 항암제 투여가 30여 년 전부터 시도되고 있다⁴⁾. 그러

나 단순하게 종양 내에 항암제를 투여하면 정상 뇌세포에도 독성을 나타내므로¹³⁾, 정상 뇌세포에 독성을 나타내지 않을 정도의 항암제 농도에 의해서 선택적으로 뇌종양 세포에만 영향을 줄 수 있도록 낮은 농도를 지속적으로 유지하고자 Ommaya reservoir, Gelfoam, biologic glue 등이 사용되었다.

근래에 폴리머, micelle등이 도입되면서 항암제가 오랫동안 지속적으로 방출될 수 있는 여러 가지 폴리머에 의한 뇌종양 내 항암제 치료법이 시도되었고^{5-7,11,13,17)}, 최근에는 BCNU 폴리머로서 Gliadel[®]이라는 상품이 만들어져 미국식약청허가를 받고 임상에 사용되기에 이르렀다^{24,25)}. 그러나 지금까지 개발된 폴리머에 의한 약제 방출 지속시간이 2~6주 정도로 예전에 비해서는 향상되었지만 아직도 짧은 시간이고, 필름형태이기 때문에 수술 후에는 적용이 가능하지만 수술 전에는 사용이 불가능하며, 수술부위의 감염문

• Received : November 7, 2003 • Accepted : December 13, 2003
 • Address for reprints : Soo Han Yoon, M.D., Department of Neurosurgery, School of Medicine Ajou University, San 5, Wonchondong, Paldal-gu, Suwon 442-721, Korea
 Tel : 031) 219-5230, 5233, Fax : 031) 219-5238
 E-mail : ee80@ajou.ac.kr

제로 인해 실제 임상에 적용되고 있지만 여기에 따르는 여러 위험 요소가 거론되고 있다²³⁾.

이에 저자들은 주사기에 의해서 주입할 수 있으며, 지속적인 장기간 방출이 가능하고, 경제적으로 저가이며, 임상에 폭넓게 적용할 수 있는 폴리머를 개발하여 종양 내에 항암제를 투여하는 약물 전달 시스템을 새로이 구축하고자 폴리머를 합성하고 우선 세포실험을 통해 동물에 부작용을 나타내지 않을 정도의 적은 용량의 항암제를 포함한 항암제 폴리머에 의해서 체외실험에서 종양세포를 사멸시킬 수 있는지를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

폴리머 합성

연구진은 ethylene glycol의 random copolymer와 caprolactone polymer의 중합비율에 의해서 약 50°C 이상에서는 액체이지만 37°C의 온도에서는 고체로 변화하는 6개의 온도 조절성 폴리머 (Poly 1-6)를 개발하였다. 이 중에서 물리적 특성이 우수한 Poly 2 (분자량15,000)와 Poly 6 (분자량16,100) 2개의 폴리머에 항암제 CDDP를 1:9의 중량비로 배합하여 항암제 폴리머를 합성한 후 실험을 수행하였다(Fig. 1).

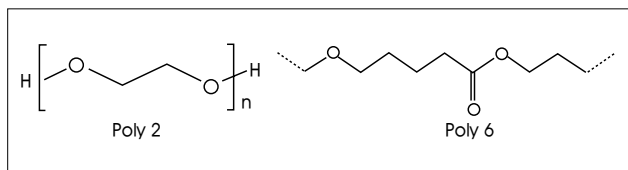


Fig. 1. Chemical structure of Poly 2 and Poly 6 : Poly 2 is random hydrophobic copolymer based on poly(ethylene-glycol) and Poly 6 is combined Poly 2 with poly(caprolactone diol).

항암제 폴리머의 항암제 방출속도 측정

CDDP를 배합한 Poly 2와 Poly 6을 10mg씩 pH 7.4 phosphate buffer saline(NaCl 0.138M, KCl 0.0027M) 25ml 37°C의 shaking water bath에서 3000rpm으로 교반하면서 2일마다 용액에서 100ul를 추출하여 cisplatin의 농도를 자외선 분광기로 300nm에서 측정하였다.

항암제 중합체의 효과

C6 glioma 세포주를 5% 우혈청 DMEM(Dolbecco's minimal essential media)용액을 사용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양한 후 충분한 세포수가 확보되면 3×10⁵개의 세포를 6 well plate에 seeding하여 24시간동안 배양하였다²⁰⁾. 고체상태인 polymer 2와 polymer 6을 100°C의 물에서 증탕하여 액체상태로 만든 후 1ml 주사기를 이

용하여 poly-D-lysine으로 coating된 cover slip에 각각 20ul, 30ul, 40ul씩 놓고 실온에서 고체화시켰다. Cover slip과 같이 고형화된 polymer를 24시간 배양한 C6 glioma 세포주가 있는 각 well의 가운데에 위치시키고 12시간마다 0.1mm간격으로 눈금이 있는 film을 이용하여 임의의 3구역을 설정하여 사진을 찍고 살아있는 세포의 수를 세었다.

결 과

폴리머에 의한 cisplatin 방출시간 측정

폴리머가 임상에 적용되기 위해 필요한 요건인 방출기간과 지속성을 확인하기 위하여 폴리머에 포함되어 있는 CDDP의 농도를 자외선 분광기를 사용하여 측정하였다. 그 결과 일반 폴리머에서 문제점으로 지적되고 있는 초기의 덩핑현상이 전혀 나타나지 않았다. Poly 2의 경우 방출속도가 일정하고 속도가 충분히 느려 1달 동안 12.6%의 CDDP가 방출되었고 Poly 6은 6일에서 12일 사이, 21일에서 31일 사이에서 방출속도가 빨라진 것이 관찰되었지만 1달 동안 56.9%의 CDDP가 방출되었다(Fig. 2).

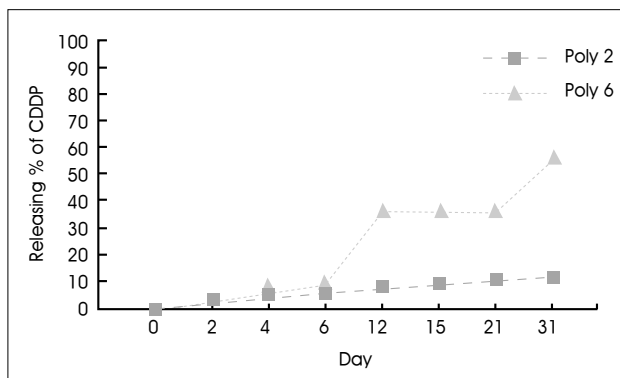


Fig. 2. Release profiles of cisplatin from Poly 2 and Poly 6 in vitro, there was no early dumping phenomenon of cisplatin from Poly 2 and Poly 6.

C6 glioma cell을 사용한 Poly 2와 Poly 6의 항암효과

CDDP가 배합되어 있는 각 폴리머의 항암효과를 알아보기 위해 C6 rat glioma 세포주를 사용하여 실험하였다. 각 폴리머에는 1/10의 농도로 희석된 CDDP가 포함되어 있고 Poly 2와 Poly 6을 각각 20ul, 30ul, 40ul씩 C6 glioma 세포에 처리한 후 12시간 간격으로 CDDP에 의한 세포독성효과를 관찰하였다. Poly 2를 처리하고 각 시간대에 따른 세포의 생존율은 20ul를 처리한 경우 100, 100, 80.5, 44.2, 36.8, 16.3%이었으며, 30ul를 처리한 경우 100, 98.1, 71.3, 38.5, 19.5, 5.6%이었고, 40ul를 처리한 경우 100, 96.4, 68.0, 28.8, 11.0, 3.5%이었다 (Fig. 3, 5). Poly 6의 처리에

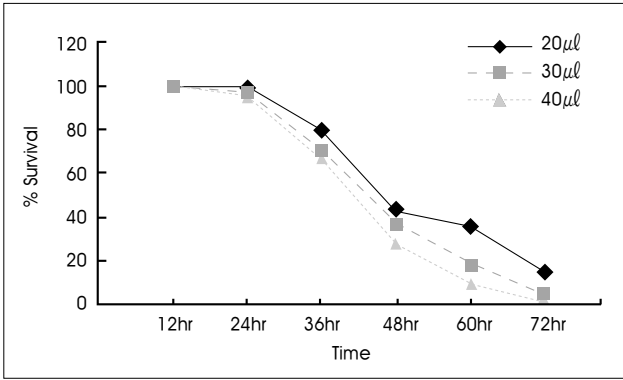


Fig. 3. The graph shows the antitumor effects of Poly 2 on C6 glioma cells in vitro.

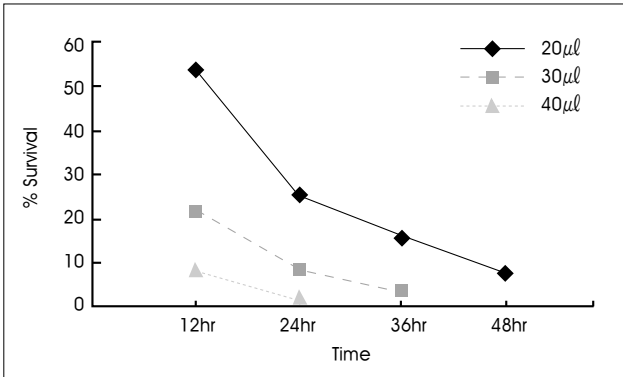


Fig. 4. The graph shows the antitumor effects of Poly 6 on C6 glioma cells in vitro.

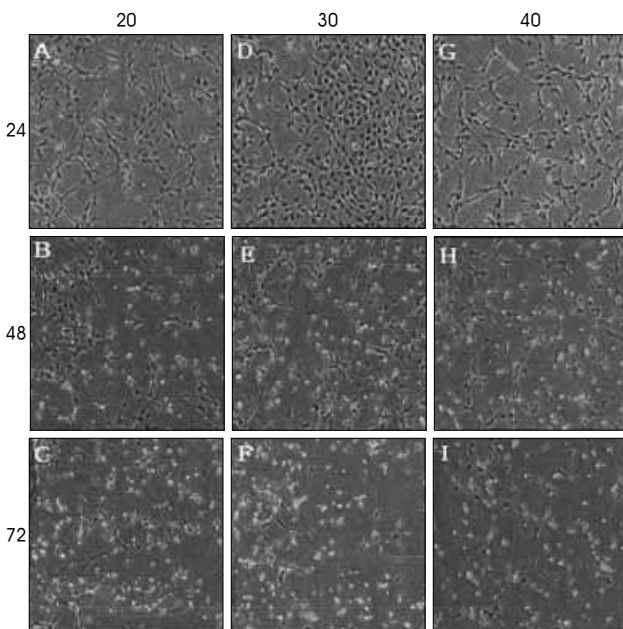


Fig. 5. Survival of C6 cells after Poly 2 treatment. A–C : Cells treated with 20µl Poly 2 for 24, 48, and 72hr, respectively. D–F : Cells treated with 30µl Poly 2 for 24, 48, and 72hr, respectively. G–I : Cells treated with 40µl Poly 2 for 24, 48, and 72hr, respectively.

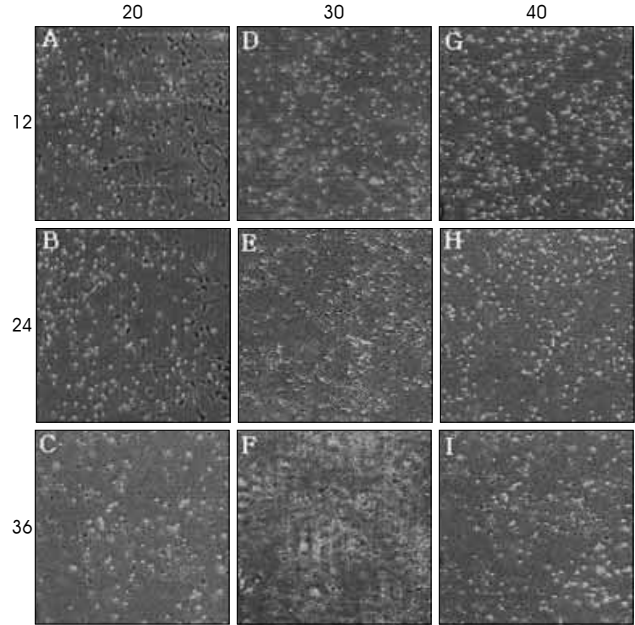


Fig. 6. Survival of C6 cells after Poly 6 treatment. A–C : Cells treated with 20 µl Poly 6 for 12, 24, and 36 hr, respectively. D–F : Cells treated with 30 µl Poly 6 for 12, 24, and 36 hr, respectively. G–I : Cells treated with 40 µl Poly 6 for 12, 24, and 36 hr, respectively.

의한 세포 생존율은 20µl를 처리한 경우 53.5, 25.4, 15.7, 7.9%이었으며, 30µl를 처리한 경우 21.2, 10.2, 3.3%이었고, 40µl를 처리한 경우 9.4, 2.7%이었다 (Fig. 4, 6). 그리고, 항암제가 없는 폴리머만을 처리한 대조군에서는 세포괴사현상이 나타나지 않았다 (자료생략).

고찰

뇌 교종의 수술은 여타 장기와는 달리 중추신경에서 이루어지기 때문에 안전한 경계까지 충분히 절제할 수 없다는 특수한 제한성이 있게 되는데, 이를 보완하기 위해 방사선, 항암제 치료를 병행하여 시도하고 있지만 비효과적이며 그 자체도 적용이 제한적일 수밖에 없다는 한계가 있다. 최근에 종양내 방사선 치료와 뇌정위적 방사선 치료가 개발되어 사용되고 있으나 아직까지도 완치를 증가에 명백한 효과가 있다고 평가하기는 어렵다¹⁾.

CDDP는 platinum이 DNA에 결합하여 세포증식 억제효과를 나타내는 현재 종양 치료에 널리 사용되고 있는 항암제이다³⁾. 그러나, 혈뇌 장벽의 효과적인 투과율이 낮고, 조혈세포와 타 장기에 대한 독성으로 인한 전신적 부작용을 초래하지 않으면서 뇌 교종에 효과적으로 작용하기 힘들고, 정맥주사시 활성화 상태의 지속시간이 짧고 생체 내에서 빠르게 제거되는 등의 실제적인 문제점이 해결되어야 한다^{9,18)}. 이러한 이유로 정맥 투여를 이용한 항암제 치료에 대

한 문제점을 해결하기 위한 방법으로서 직접 뇌종양 내에 항암제를 투여하는 방법이 제기되었지만 뇌 척수액의 순환으로 항암제 농도가 급격히 낮아지기 때문에 지속시간이 짧다는 단점이 있어 효과를 기대하기 어렵다⁴⁾.

그러나 폴리머를 이용한 약물전달체계의 도입으로 뇌내부에서 직접 항암제를 종양세포에 지속적으로 전달할 수 있게되어 항암제를 정맥주사하거나 뇌종양 내부에 직접 항암제를 주사하는 방법에 비해서 독성효과에 의한 전신적 부작용이 없고, 낮은 농도의 항암제를 투여하므로 뇌세포 독성도 적으며, 따라서 장기간 항암제 투여가 가능하며, 무엇보다도 혈뇌 장벽의 투과에 대한 문제점을 해결할 수 있다는 가능성이 제시되어 이를 이용한 치료요법들이 활발하게 연구되고 있다^{10,13,24)}.

임상에 적용되기 위해 폴리머는 주사하기 쉬운 액체상태로 만들어져야하고, 체내의 병소에 주사된 후에는 gel 또는 고체로 빠르게 변화하여야 하며, 투여할 약제와 균일하게 섞여서 방출되는 약제의 농도와 속도가 일정하여야 하고, 분해속도가 적절하여 목적인 시간 동안 약제의 방출이 이루어져야 하며, 폴리머에 의한 약물전달의 공통적 문제점인 초기와 말기에 발생하는 덩핑현상이 적어야 하고, 마지막으로 폴리머 분해에 의해 생성되는 부산물이 인체에 해롭지 않아야 한다는 특성이 있어야 한다^{2,5,21)}. 폴리머에 의해 항암제를 방출 전달하는 방법은 Gliadel이라는 상품명으로 시판되고 있지만 필름형태이므로 수술한 후에 남은 종양 부위에는 사용할 수 있지만 수술 전에 종양 내에 주입할 수 없다는 문제점이 있다^{23,25)}. 또한 Gliadel이나 현재 개발된 많은 폴리머의 지속시간이 대개 2~6주 정도로 일반적인 항암치료보다는 크게 증가하였지만 초기와 말기에 시간당 약물방출이 수십 배로 급격하게 증가한다는 단점 때문에 충분한 양의 항암제를 폴리머에 넣을 수 없고 결국 효과적인 치료가 이루어지지 못하고 있다.

폴리머는 크게 친수성과 혐수성, 또는 양극에 대한 친화성의 정도에 의해 그 종류를 나눌 수 있고 조건에 따라 3차원 구조의 재배치가 이루어져 주사를 가능하게 할 수 있다. 이러한 폴리머의 물리적 변화는 여러 가지 조건에 의해 이루어질 수 있는데 그 중에서 최근에 온도에 의해 상온 혹은 일정온도 이하에서는 sol상태이지만 주사에 의해 체내에 주입되어 신체온도와 비슷한 36°C 또는 일정온도 이상에서는 gel상태로 변화되는 체계가 개발되어 임상치료에 적용가능성이 높은 것으로 나타나 이에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다^{14,15)}. 이러한 최신의 온도조절에 의한 gel-sol 변성 폴리머에서도 약물 방출속도와 초기에 배합된 약물이 급격히 방출되는 덩핑현상은 아직도 개선이 되지 못하고 있다^{8,14,15)}. 그러나 본 실험에서 사용된 폴리머는 반대로 약 50°C 이상에서는 sol이고, 그 이하에서는 천천히 gel로 바뀌는 성질을 가진 것으로 50°C 이상 온도

에서 용액으로 만들어 식히면 약 40°C에서 용액으로 주사가 가능하며, 주사 후 약 10~20분 이내에 고체로 변하므로 안전성도 높고 판단되었다. 따라서 주사가 가능한 안전성이 있으면서 항암제 방출속도가 체외실험에서 비교적 일정하고 속도도 충분히 느려서 전체 약물 방출 기간이 3개월 이상이 되었으며, 초기 덩핑현상도 없어 새로운 약물 전달체계의 사용하기에 충분한 가능성을 가지고 있다고 생각되었다.

C6 glioma 세포주를 이용한 CDDP의 종양세포 효과에 대해서 Noda 등¹⁹⁾에 의하면 세포실험에서 5×10^{-6} M 농도의 CDDP를 처리했을 때 72시간째에 전형적인 apoptotic cell이 나타내기 시작하고, 3×10^{-5} M을 처리했을 경우 72시간째에 90% 이상의 세포들이 죽는다고 보고되었다. 또한 임상실험에서 Stephen 등²²⁾에 의하면 정맥을 통해 CDDP(50mg/m²의 농도로 4주간 주입하여 총 축적농도가 600mg/m²)를 주입한 경우 뇌에서 0.17ug/g의 platinum이 검출되었지만 종양을 치료할 수 있는 충분한 항암효과를 나타내지 못했다.

본 실험에서 20ul의 Poly 2를 처리했을 경우 24시간까지 세포의 증식이 중지되었고 24시간 이후부터는 급격히 사멸되는 세포가 관찰되었다. 폴리머 20ul는 대략 20mg에 해당하며 이 실험에서 사용한 Poly 2와 6은 폴리머와 CDDP가 9:1의 비율로 섞여있어 Poly 2에 포함되어 있는 CDDP는 20mg의 1/10에 해당하는 2mg이라고 할 수 있다. 폴리머의 항암제 방출속도를 측정한 실험(Fig. 2)에서 Poly 2가 48시간동안 방출한 항암제의 양은 전체의 2.7%이었다.

이 실험에서 세포가 죽기 시작한 시점은 24시간 이내로 이 때 CDDP의 방출량은 exponential curve이므로 적어도 48시간째에 방출된 양의 1/2이하이며 이 때 방출될 수 있는 CDDP의 양은 최대 1.35%이다. 배양액의 양이 3ml이고 폴리머의 양은 20mg이므로 well에는 20mg/3ml의 농도로 Poly 2가 존재하고 있고 24시간째에 배양액에 존재할 수 있는 CDDP의 최대량은 2mg/3ml의 1.35%인 9 ug/ml이므로 CDDP 분자량이 300.1임을 적용하면 즉 최대 축적농도는 3×10^{-5} M이 된다. 이것은 C6 glioma 세포에 1.66×10^{-5} M의 CDDP를 처리하였을 때 24시간째에 세포분열이 멈춘다는 Krajci 등¹⁶⁾의 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 또한 Poly 6의 항암제 방출속도를 측정한 결과 1달 동안 56.9%의 약물이 방출되어 Poly 2보다 빠른 방출속도를 가지고 있어 단기간 집중적인 치료에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 본다.

동물실험에서도 유사한 결과가 관찰된다면 임상에 적용하여 현재까지 보고된 문제점인 CDDP의 지속적인 투여에 의해 나타나는 부작용을 줄일 수 있고, 종양과 종양주위에 고농도의 항암제치료를 효율적으로 할 수 있게 됨으로써 더욱 적극적인 항암제 치료가 가능해질 것이며, 현재 시행되는 정맥주사로 여러 가지 항암제를 병

행하여 치료하는 방법들보다 더 간단하면서도 효과적인 치료가 이루어질 것으로 추측된다.

결 론

본 연구에서는 in vitro 상에서 항암제 폴리머 Poly 2와 Poly 6이 초기 덩핑현상이 없으면서도 31일간 각각 12.9%와 56.9%의 항암제가 방출되어 Poly2는 적어도 3개월 이상, Poly6은 2개월 정도 지속적으로 항암제가 방출될 수 있다고 예상된다. C6 신경교종 세포 배양에서 20ul의 poly-2 항암제 폴리머의 양에 의해서 충분히 종양세포의 과사가 이루어졌으므로 뇌종양 동물 모델에서 이 크기 이하에서 시도가 가능할 것으로 추정하였다. 한편 신경교종 세포 배양에서 항암제 폴리머의 양에 비례하여 종양세포의 과사 정도 또한 늘어나는 것으로 나타났다. 향후, 위 연구 결과를 바탕으로 뇌종양 동물 모델에서 항암제 폴리머의 효과를 측정하여 임상에 응용될 수 있기를 기대한다.

• Acknowledgement

본 연구는 학술진흥재단의 지원으로 이루어졌으며 (KRF-1999-042-E00064) 대한신경외과학회 2003년도 춘계학회에서 발표되었음.

References

1. Alexander E 3rd, Loeffler JS : Radiosurgery for primary malignant brain tumors. **Semin Surg Oncol** 14 : 43-52, 1998
2. Araki H, Tani T, Kodama M : Antitumor effect of cisplatin incorporated into polylactic acid microcapsules. **Artificial Organs** 23 : 161-168, 1999
3. Barry MA, Behnke CA, Eastman A : Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. **Biochem Pharmacol** 40 : 2353-2362, 1990
4. Bouvier G, Penn RD, Kroin JS, Bique RA, Gurard M-J, Lesage J : Stereotatic administration of intratumoral chronic chemotherapy of recurrent malignant gliomas. **Appl Neurophysiol** 50 : 223-226, 1987
5. Brem H, Gabikian P : Biodegradable polymer implants to treat brain tumors. **J Controlled Release** 74 : 63-67, 2001
6. Brem H, Piantadosi SP, Burger C, Walker M, Selker R, Vick NA, et al : Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. **Lancet** 345 : 1008-1012, 1995
7. Brem H : Polymers to treat brain tumours. **Biomaterials** 11 : 699-701, 1990
8. Chilkoti A, Dreher MR, Meyer DE, Raucher D : Targeted drug delivery

- by thermally responsive polymers. **Adv Drug Deliv Rev** 54 : 613-630, 2002
9. Daley-Yates PT, McBrien DC : Cisplatin metabolites in plasma, a study of their pharmacokinetics and importance in the nephrotoxic and antitumour activity of cisplatin. **Biochem Pharmacol** 33 : 3063-3070, 1984
10. Deurloo MJ, Kop W, van Tellingen O, Bartelink K, Begg AC : Intratumoral administration of cisplatin in slow-release devices : II- Pharmacokinetics and intratumoural distribution. **Cancer Chemother Pharmacol** 27 : 347-353, 1991
11. Domb A, Maniar M, Bogdanský S, Chasin M : Drug delivery to the brain using polymers. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst** 8 : 1-17, 1991
12. Donelli MG, Zucchetti M, D'Incalci M : Do anticancer agents reach the tumor target in the human brain? : **Cancer Chemother Pharmacol** 30 : 251-260, 1992
13. Duncan R : Drug-polymer conjugates : Potential for improved chemotherapy. **Anticancer Drugs** 3 : 175-210, 1992
14. Jeong BM, Kim SW, Bae YH : Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. **Adv Drug Deliv Rev** 54 : 37-51, 2002
15. Jeong B, Choi YK, Bae YH, Zentner G, Kim SW : New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems. **J Control Release** 62 : 109-114, 1999
16. Krajci D, Mares V, Lisa V, Spanova A, Vorlicek J : Ultrastructure of nuclei of cisplatin-treated C6 glioma cells undergoing apoptosis. **Eur J Cell Biol** 79 : 365-376, 2000
17. Langer R : Drug delivery and targeting. **Nature** 392 : 5-10, 1998
18. Nakagawa H, Fujita T, Kubo S, Tokiyoshi K, Yamada M, Kanayama T, et al : Difference in CDDP penetration into CSF between selective intraarterial chemotherapy in patients with malignant glioma and intravenous or intracarotid administration in patients with metastatic brain tumor. **Cancer Chemother Pharmacol** 37 : 317-326, 1996
19. Noda S, Yoshimura S, Sawada M, Naganawa T, Iwama T, Nakashima S, et al : Role of ceramide during cisplatin-induced apoptosis in C6 glioma cells. **J Neurooncol** 52 : 11-21, 2001
20. Pu P, Liu X, Liu A, Cui J, Zhang Y : Inhibitory effect of antisense epidermal growth factor receptor RNA on the proliferation of rat C6 glioma cells in vitro and in vivo. **J Neurosurg** 92 : 132-139, 2000
21. Sheleg SV, Korotkevich EA, Zhavrid EA, Muravskaya GV, Smeyanovich AF, Shanko YG, et al : Local chemotherapy with cisplatin-depot for glioblastoma multiforme. **J Neurooncol** 60 : 53-59, 2002
22. Thompson SW, Daris LE, Kornfeld M, Hilgers RD, Standefer JC : Cisplatin neuropathy, clinical, electrophysiology, morphologic, and toxicologic studies. **Cancer** 54 : 1269-1275, 1984
23. Subach BR, Witham TF, Kondziolka D, Lunsford LD, Bozik M, Schiff D : Morbidity and survival after 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-Nitrosourea Wafer implantation for recurrent glioblastoma : A retrospective case-matched cohort series. **Neurosurgery** 45 : 17-23, 1999
24. Wang CC, Li J, Teo CS, Lee T : The delivery of BCNU to brain tumors. **J Control Release** 61 : 21-41, 1999
25. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, et al : A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. **Neurooncology** 5 : 79-88, 2003