

3.2 Material und Methoden

Die durchgeführten Experimente wurden in *in vitro*- und *in vivo*-Versuche unterteilt. Die *in vitro*- Untersuchungen dienten der physikochemischen Charakterisierung der PMMA-Nanopartikel. Im zweiten Teil wurden die kolloidalen Trägersysteme auf ihre Körperverteilung im Tier hin analysiert. Für die Tierstudien wurden radioaktiv markierte PMMA-Nanopartikel hergestellt, die eine genaue Lokalisation in den einzelnen Organen erlaubten. Es war aus Gründen der Kontaminationsgefahr nicht möglich, die radioaktiven Nanopartikel für die *in vitro* Untersuchungen zu verwenden. Zu diesem Zweck wurden unter gleichen Bedingungen hergestellte PMMA-Partikel, die sich nur durch ein ausgetauschtes nichtstrahlendes Kohlenstoffnuklid unterschieden, verwendet.

3.2.1 *in vitro*-Untersuchungen

3.2.1.1 Herstellung nichtradioaktiver Nanopartikel

Für die Synthese der Polymethylmethacrylat-Nanopartikel wurde das Monomer Methylmethacrylat (Merck, Deutschland) verwendet. Da diese Substanz schnell polymerisiert, wird vom Hersteller der Stabilisator (Hydrochinon) hinzugefügt, der aber vor der Verwendung des Monomers entfernt werden mußte. Zu diesem Zweck wurde das Methylmethacrylat mit einer Salzlösung (5 g NaOH, 20 g NaCl add 100 ml H₂O) in einem Verhältnis von 5:1 versetzt (Kreuter, 1997). Das entstandene Gemisch wurde in einen Scheidetrichter gefüllt und so lange geschüttelt, bis es zu einer deutlichen Phasentrennung kam. Die Salzlösung mit dem ausgeschüttelten Hydrochinon in der unteren Phase wurde abgelassen und verworfen. Der Prozeß wurde insgesamt dreimal mit der Salzlösung und anschließend dreimal mit Wasser wiederholt. Nach der Reinigung wurde das Monomer in einer 0,15 molaren Phosphatpufferlösung (pH 7,4) gelöst, so daß eine 1% Lösung entstand. Die Lösung wurde in eine 500 ml Schottflasche (Roth, Karlsruhe) gefüllt und in einer Cobaltquelle (500 krad) mit Gammastrahlen zur Polymerisation angeregt. Das entstandene Polymer-Phosphatpuffer-Gemisch wurde in einer Gefriertrocknungsanlage (Christ Alpha 2-4, Osterode) getrocknet. Das Lyophilisat bestand zu 56,3% aus Puffersalz (zweibasisches Natriumphosphat-Dihydrat-einbasisches Kaliumphosphat-Natriumchlorid) (7,6:1,45:4,8; w/w/w) und zu 43,7% aus Polymethylmethacrylat. Die Lagerung des Lyophilisates erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

3.2.1.2 Tenside

Als Tenside für die Beschichtung der Nanopartikel kamen zum Einsatz:

- Polysorbat 80 (Handelsnamen Tween 80, Sigma, Göttingen),
- Poloxamer 407 (Handelsname Pluronic F127, Erbslöh, Krefeld) und
- Poloxamin 908 (Handelsname Tetronic 908, BASF, Mount Olive, USA).

Die Tenside wurden luftdicht verschlossen und vor Sonneneinstrahlung geschützt aufbewahrt.

3.2.1.3 Herstellung der Partikelpräparationen

a) Unbeschichtete Präparationen:

Das gefriergetrocknete Nanopartikelpulver (25,83 mg) wurde in 10 ml destilliertem Wasser (sterilfiltriert) suspendiert und anschließend 20 min in einem Ultraschallwasserbad (T570, Roth, Karlsruhe) mit 35 kHz beschallt. Da die unbeschichteten Nanopartikel schnell aggregieren, erfolgte vor jeder Untersuchung eine weitere Beschallung von 20 s.

b) Beschichtete Präparationen:

Es wurden 25,83 mg Lyophilisat in 5 ml destilliertem Wasser (sterilfiltriert) suspendiert. Nach 5min Beschallung erfolgte die Zugabe von je 5 ml einer 2% Tensidlösung:

- Polysorbat 80,
- Poloxamer 407,
- Poloxamin 908.

Es entstand eine 1% Gesamtmischung, die dann weiter 15 min beschallt wurde.

Sowohl Kontrolle als auch die beschichteten Präparationen ergaben eine Suspension von 1,129 mg PMMA pro 1 ml Medium.

3.2.1.4 Charakterisierung der PMMA-Partikel

3.2.1.4.1 Größenmessungen in destilliertem Wasser

Die Partikelgrößen der vier verschiedenen PMMA-Präparationen wurden mit dem Größenmessgerät LS230 (Coulter Technics, Miami, USA) ermittelt. Das Gerät arbeitet mit zwei unterschiedlichen Meßverfahren, die es ermöglichen, Partikelgrößen in einem Bereich von 0,04-2000 μm zu bestimmen. Im Bereich von 0,8-2000 μm kommt die Laserdiffraktometrie zum Einsatz. Das Meßprinzip beruht auf Laserlichtbeugung, bei der ein Laserstrahl, nachdem er mit einem optischen System aufgeweitet wurde, auf die Partikel im Meßvolumen geleitet wird. An den Partikeln kommt es in Abhängigkeit von der Partikelgröße und -form zu charakteristischen Beugungsbildern. Zwei nachgeschaltete Fourierlinsen sorgen dafür, daß die entstandenen Beugungsbilder immer dieselbe Position auf dem Detektor einnehmen. Die Intensität des gebeugten Lichtes wird von den Detektoren erfaßt und im Computer ausgewertet.

Neben der Laserdiffraktometrie wird im LS230 ein speziell für den Submikrobereich entwickeltes Messverfahren, die PIDS-Technologie (Polarization Intensity Differential Scatting) genutzt. Im Gegensatz zur Laserlichtbeugung wird hier die Streuung polarisierten Lichtes ausgenutzt. Während des Messprozesses werden die Proben sowohl mit horizontalem als auch mit vertikalem polarisiertem Licht dreier verschiedener Wellenlängen (450, 600, 900 nm) bestrahlt und unter verschiedenen Winkeln mittels Detektoren analysiert.

Die Meßwerte beider Verfahren werden mit einer speziellen Software zusammengefaßt und als ein Ergebnis dargestellt.

3.2.1.4.2 Größenmessungen im Plasma

Für die Untersuchung des Verhaltens der Nanopartikel im Plasma, wurde humanes Spenderplasma aus der Blutspendestation Berlin-Buch zur Verfügung gestellt. Als Antigerinnungsmittel kam Natriumzitrat zum Einsatz. Das Plasma wurde in 10 ml Proben aliquotiert und bei -20°C gelagert, so daß die Plasmaproben für die weitere Verwendung nur einmal aufgetaut werden mußten.

Um die Größe der Partikelaggregate im Plasma bestimmen zu können, wurden dieses zunächst von korpuskulären Bestandteilen gereinigt. Zu diesem Zweck war es nötig, die Plasmaproben zu filtrieren, da sich in jeder Plasmaprobe bis zu 100000 Blutzellen befinden können (Schrapel, 1998). Die Blutzellen könnten zu einer Überlagerung mit den Nanopartikeln während des Meßprozesses führen und so keine eindeutige Aussage über das

Verhalten der Partikel im Plasma zulaßen. Das Plasma wurde zweimal mit einer Filtrationshülse (Sartorius, Göttingen) durch einen Polycarbonfilter (Nucleopor-track-atch-membrane, Corning, UK) mit einem Porendurchmesser von 1 µm gedrückt und zur Kontrolle mit dem LS230 größenvermessen. Die Nanopartikelpräparationen

a; Kontrolle,

b: mit Polysorbat 80 ,

c: mit Poloxamer 407 und

d: mit Poloxamin 908 wurden beschichtet und wie oben beschrieben beschallt. Im Anschluß daran erfolgte eine 5 minütige Inkubation der einzelnen Proben bei 37°C im filtriertem Plasma. Das Verhältnis Plasma zu Partikeln betrug 5:1. Die Inkubationszeit von 5 min wurde gewählt, da es *in vivo* bereits innerhalb dieser Zeitspanne zur Elimination großer Partikelmengen durch die Zellen des RES kommt (Blunk, 1994).

3.2.1.4.3. Zeta-Potential

Die Partikelladung wird über die Bestimmung ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit im elektrischen Feld ermittelt und üblicherweise als Zeta-Potential angegeben (Maaßen et al., 1993). Das Zeta-Potential kennzeichnet die Stabilität von Systemen, die dispergierte Partikel enthalten, indem es den Grad der Abstoßung zwischen benachbarten und ähnlichgeladenen Partikeln bestimmt. Unterschreitet das Zeta-Potential eines kolloidalen Systems einen bestimmten Wert, so kommt es zur Ausflockung oder Aggregation.

Auf der Oberfläche von Teilchen kommt es in einem flüssigen Medium zur festen Adsorption von Ionen in zwei Schichten. Diese Schichten werden als innere und äußere Sternschicht bezeichnet. An diese beiden Schichten schließt sich eine sog. diffuse Schicht an, die aus locker gebundenen Gegenionen besteht. Durch Diffusionsbewegungen der Teilchen kommt es zur Reibung und zu einer teilweisen Abstreifung der diffusen Schicht. Unter dem Zeta-Potential von Partikeln versteht man das Potential zwischen der Scherebene, die nach Abstreifen (z.B. Diffusion, Beschleunigung im elektrischen Feld) der diffusen Schicht an den Partikeln entsteht und dem neutralem Umgebungsmilieu.

Wird jetzt wie im Zeta-Potentialmeßgerät ein elektrisches Feld aufgebaut, so bewegen sich die geladenen Teilchen auf die entgegengesetzt geladene Elektrode zu. Es können nur Teilchen beschleunigt werden, die aufgrund der Feldeinwirkung eine Ladungsverschiebung erfahren und damit ein Dipoleffekt erzeugen oder Teilchen, die durch Diffusion ein Teil der locker gebundenen Gegenionen abgestreift haben und ebenfalls polarisiert werden. Mit zunehmender Beschleunigung der Partikel durch das elektrische Felde kommt es auch zur

Zunahme der Reibung und zu einer Verlagerung der Scherebene nach innen bis fast an die äußere Sternschicht der Partikel. Die Meßzelle wird mit Laserlicht einer bestimmten Frequenz bestrahlt, welches durch die Bewegung der Teilchen gestreut wird. Die Frequenz des gestreuten Laserlichts ist somit von der Frequenz des ursprünglichen Laserstrahls verschieden. Auf Grund dieser Frequenzverschiebung kann dadurch die Partikelgeschwindigkeit berechnet werden.

Das Potential der Nanopartikelpräparationen (**a-d**) wurde in Zetapotentialmeßgerät Delsa 440 (Coulter Technics, Miami, USA) bestimmt. Als Medium fand destilliertes Wasser Verwendung, das mit NaCl-Salz auf eine Leitfähigkeit von 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ eingestellt wurde.

3.2.1.4.4 2-D-Elektrophorese

Die hochauflösende zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die auf der von O'Farrell (1975) beschriebenen Methode basiert, ist das einzige Verfahren, das eine Auftrennung von mehreren tausend Proteinen erlaubt (Jungblut, 1995). Die Proteine werden dabei nach zwei voneinander unabhängigen Parametern, dem isoelektrischen Punkt (pI) und dem Molekulargewicht (MG) aufgetrennt (Blunk, 1994). Das Ergebnis ist ein Spotmuster, für das sich folgendes Koordinatensystem durchgesetzt hat: von links nach rechts der steigende pI und von unten nach oben das steigende MG. Die Auswertung der Gele erfolgte unter Zuhilfenahme des SWISS-2-D-Page-Programm, welches unter World Wide Web erhältlich ist und 2-D-Referenzgele für verschiedene Gewebe und für humanes Plasma enthält.

Versuchsdurchführung:

Die Durchführung erfolgt im wesentlichen nach der von Hochstrasser et al. (1988) beschriebenen Methode. Alle Chemikalien, die nicht mit Hersteller und Ort beschriftet sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

- Inkubation der Partikel in humanem Plasma und Serum:

Da nur Referenzgele von humanen Plasmen vorhanden sind, wurden die Untersuchungen in humanem zitratstabilisiertem Plasma durchgeführt. Da eine Komplementaktivierung im mit Zitrat versetzten Plasma nicht möglich ist (Kinoshita, 1991), wurden die Präparationen zusätzlich auch in humanem Serum untersucht. Die 4 Partikelzubereitungen (**a, b, c, d**) wurden für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Partikelpräparationen müssen als 2,5% Suspension eingesetzt werden, um einmal eine ausreichende Proteinmenge für die weiter Bearbeitung zu erhalten und um die Spots gleicher Proteine zwischen zwei Gelen vergleichen zu können.

- Separation der Partikel vom überschüssigem Plasma:

Nach der Inkubation mußte das nicht gebundene Plasma wieder entfernt werden. Die Proben wurden dazu bei 14000 g 60 min lang zentrifugiert (2K15, Sigma, Göttingen). Nach Entfernung des Überstands wurden die Proben in Aqua dest. resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschprozeß wurden insgesamt viermal wiederholt.

- Desorption der adsorbierten Proteine:

Nach Abschluß der Separationsschritte wurden die Proteine von der Oberfläche desorbiert. Dazu wurden die Proben in einer mit Dithioerythrol (DTE) versetzten SDS-Lösung 5 min auf 95°C erhitzt. Nach einer kurzen Abkühlzeit folgte eine Verdünnung mit einer Lösung aus Harnstoff, CHAPS (zwitterionisches Tensid), DTE und Ampholyten (Ampholine). Das SDS (Natriumdodecylsulfat) spielt bei der Desorption der Proteine eine zentrale Rolle. Es kommt zu einer vollständigen Aufspaltung von Proteinen, Proteinkomplexen und Aggregaten in lösliche Polypeptide (Dunn, 1987).

Die mit diesem Protokoll erreichte Proteindesorption lag in der Arbeit von Blunk et.al (1994) bei 90%.

- 1. Dimension (Isoelektrische Fokussierung):

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine Methode, um die Proteine nach ihrem isoelektrischem Punkt (pI) in einem pH-Gradienten aufzutrennen. Proteine sind aufgrund der sauren und alkalische Aminosäuren positiv oder negativ geladen. Der pI ist der pH bei dem ein Protein eine Nettoladung von Null besitzt. Die Proben wurde in selbstgegossenen Polyacrylamidgelen (Länge 160 mm, Durchmesser 1,5 mm) mit einem nichtlinearen pH-Gradienten von pH 4-8 auf der Seite der Kathode mit einer 2-ml-Spritze (Braun, Melsungen) mit aufgesetzter Pipettenspitze aufgetragen. Die IEF wurde in der Tube Cell Model 175 durchgeführt, als Netzgerät diente das 1000/500 Power Supply (beide Geräte Biorad, München). Die Fokussierbedingungen waren 200 V für 2 h, 500 V für 5 h und 1000 V für 10,5 h.

- 2. Dimension (Auftrennung nach MG):

Nach Ablauf der IEF wurden die Röhrengel aus den Glasröhrchen extrudiert und mit Transferpuffer versetzt, der neben SDS noch Bromphenolblau als Frontmarkierer enthielt. Durch die Verwendung von SDS kommt es zur Entstehung von anionischen Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit. Die elektrophoretische Mobilität der Proteine ist

dann eine lineare Funktion der Logarithmen der Molekulargewichte. Die Gele wurden unverzüglich an die Gelplatten der zweiten Dimension angelegt und die Elektrophorese in der Protean-II-D-Multi-Cell in Verbindung mit dem Netzteil 1000/500 Power Supply durchgeführt. Die Gele enthielten einen linearen Acrylamidgradienten von 8-18% und einen Vernetzungsgrad von 2,5%, PDA wurde wieder als Quervernetzer verwandt. Die Porengröße wird über die Acrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad bestimmt. Die Gele für die zweite Dimension wurden in der Protean-II-Multi-Gel-Gießkammer mit Hilfe des Gradientenformers Modell 375 (beide Geräte, Biorad, München) hergestellt.

- Silberfärbung:

Die Fixierung der Gele erfolgte nach Abschluß der zweiten Dimension mit dem Ziel, die schnelle Färbung der Proteine und die damit verbundene Umwandlung in unlösliche Präzipitate zu erreichen. Desweiteren wurden alle Komponenten entfernt, die keine Proteine darstellen. Das Prinzip der Silberfärbung ist eine Reduktion des ionischen zu metallischem Silber. Zur Detektion kommt es durch das unterschiedliche Redoxpotential der Proteine im Vergleich zu dem umgebenden Gel.

Alle Schritte des Färbeprotokolls (Hochstrasser, 1988) wurden auf der Schüttelmaschine (KL2, Johanna-Otto-GmbH, Hechingen) in Glas- und Plastewannen durchgeführt. Die zwischen den Färbeschritten erfolgenden Waschschrte wurden immer mit bidestilliertem Wasser vorgenommen.

- Waschen der Gele (5-10 min)
- Fixierung der Proteine mit Ethanol (40%) / Essigsäure (10%) / H₂O (60 min)
- Fixierung der Proteine mit Ethanol (5%) / Essigsäure (5%) / H₂O (ca. 8 h)
- Waschen der Gele (5 min)
- Sensitivierung mit mit Glutaraldehyd (10%) / H₂O (30 min)
- Waschen der Gele (3x10 min)
- Sensitivierung mit Naphthalin (1 g) / H₂O (2x30 min)
- Waschen der Gele (4x15 min)
- Färben mit AgNO₃ (0,8%) / NH₃(0,33%), NaOH (0,02N) / H₂O (30 min)
- Waschen der Gele (3x5 min)
- Entwicklung mit Formaldehyd (0,037%) / Citronensäure(0,01%) / H₂O
- Stop der Entwicklung mit Essigsäure (5%)

- Auswertung der 2-D-Gele:

Zur Auswertung wurden die frisch gefärbten Gele mit einem Densitometer (GS-700, Imaging Densitometer, Biorad, München) optisch abgetastet und mit Hilfe eines computergestützten Auswerteprogramms "Melanie II" (Biorad, München) bearbeitet. Die Spots wurden qualitativ und quantitativ ausgewertet. Die qualitative Auswertung bestand in der Identifizierung der Spots, dabei konnte auf 2-D-Plasmakarten (Anderson und Anderson, 1991; Golaz et al., 1993) und auf die unter World Wide Web SWISS-2Dpage (<http://www.expasy.ch.ch2d/ch2d-top.html>) enthaltenen Referenzgele zurückgegriffen werden. Da meistens ähnliche Oberflächen von Nanopartikelzubereitungen verglichen werden, adsorbieren oft die gleichen Proteine, allerdings in unterschiedlichen Mengen. Die Proteinmengen werden als Spotvolumen angegeben, dabei ist das Spotvolumen die Integration der optischen Dichte über die Fläche aller detektierten Spots. Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil eines Spots an der gesamt-detektierbaren Proteinmenge angegeben. Der direkte Vergleich der absoluten Menge zwischen unterschiedlichen Proteinen ist aufgrund der proteinspezifischen Färbereigenschaften nicht möglich.

3.2.1.4.5 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die Elektronenmikroskopie kam zum Einsatz, um die mit dem Größenmeßverfahren gefundenen Ergebnisse zu untermauern und um Form und Gestalt der Nanopartikel zu untersuchen. Die Nanopartikelproben wurden auf ein 300-mesh-Kupfernetz (Plano, Wetzlar) aufgetropft, die überschüssige Lösung nach wenigen Minuten abgesaugt und die auf dem Netz anhaftenden Nanopartikel luftgetrocknet. Die Proben wurden nativ und nach Kontrastierung mit Uranylacetat (Merck, Darmstadt) und Ammoniummolybdat im Transmissionsmikroskop (JEM100 CX, Jeol, Tokyo, Japan) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV und einer Vergrößerung von 10.000 und 50.000 untersucht. Die Ergebnisdokumentation erfolgte auf Planfilmen. Die Arbeiten auf diesem Gebiet wurden freundlicher Weise von Frau Lehmann aus der Arbeitsgruppe "Drug Targeting" des MDC Berlin-Buch vorgenommen.

3.2.1.5 Herstellung radioaktiver Nanopartikel

Für die *in vivo*-Versuche wurden speziell hergestellte radioaktiv markierte PMMA-Partikel verwendet, die es ermöglichen, eine genaue Aussage über ihre Verteilung im Körper zu machen. Zur Synthese der radioaktiven Nanopartikel wurde ein von Amersham Life Science (Little Chalfont, UK) hergestelltes Methyl(^{14}C)methacrylat-Monomer verwendet. Die Herstellung erfolgte wie bei Kreuter et al. (1979) beschrieben. Dabei wurde im 1. Schritt

Cyanohydrin aus 2-¹⁴C-Aceton hergestellt, das dann weiter zu Methyl(2-¹⁴C)methacrylat verarbeitet wurde. Nach Reinigung des Monomers und Lösung in Phosphatpuffer erfolgte die Bestrahlung in der Eidgenössischen Versuchsanstalt Wädenswil (Schweiz) mit einer ⁶⁰Co-Quelle (500 krad). Das entstandene Partikel-Puffer-Gemisch bestand zu 37,2% aus Polymethyl(2-¹⁴C)methacrylat und zu 62,8% aus Puffersalz. Das entstandene Polymer besaß eine Aktivität von 4,43 µCi/mg.

3.2.1.5.1 Herstellung der Partikelpräparationen

a) Unbeschichtete Präparationen:

Das gefriergetrocknete Nanopartikel-Puffer-Gemisch (30,34 mg) wurde in 10 ml Aqua dest. (sterilfiltriert) suspendiert. Die Partikelzubereitung (Präparationsbezeichnung **A**) wurde 20 min bei 35 kHz im Ultraschallbad (T570, Roth, Karlsruhe) behandelt. Da die unbeschichteten Nanopartikel schnell wieder aggregierten, wurde vor jeder Applikation eine erneute Beschallung für 20 s vorgenommen.

b) Beschichtete Präparationen:

Es wurden 30,34 mg Lyophilisat eingewogen und mit 5ml destilliertem Wasser versetzt. Nach einer Beschallzeit von 5 min wurden 5 ml einer 2% Tensid-lösung dazu gegeben, so daß eine 1%-tige Gesamtmischung (Tensid, PMMA, Wasser) entstand, die dann für weitere 15 min im Ultraschallbad behandelt wurde.

Als Tenside wurden für die Präparationen (B, C, D) eingesetzt:

B: Polysorbat 80,

C: Poloxamer 407,

D: Poloxamin 908.

3.2.1.5.2 Aktivität der Injektionssuspension

Das Nanopartikellyophilisat wurde für jeden Tierversuche neu eingewogen und die Präparationen jeweils frisch zubereitet.

Das Pulver mußte unter besonderen Sicherheitsbedingungen entnommen werden, da es stark hygroskopisch war. Aufgrund dieser Eigenschaft war es nicht möglich, für alle Zubereitungen exakt die gleiche Menge einzuwiegen. Je 4 Proben der Injektionssuspensionen wurden im Flüssigkeitsszintillationsmeßgerät (TRJ-Carb, Packard, Frankfurt) gemessen und dies ergab eine mittlere Aktivitäten von:

Tab. 5 : Konzentration ($\mu\text{Ci/ml}$) der radioaktiv markierten Injektionssuspensionen (A, B, C, D), angegeben als Mittelwert mit Standardabweichung

| Präparation | A [$\mu\text{Ci/ml}$] | B [$\mu\text{Ci/ml}$] | C [$\mu\text{Ci/ml}$] | D [$\mu\text{Ci/ml}$] |
|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Versuch I | 5,98 $\pm 0,01$ | 5,14 $\pm 0,08$ | 5,09 $\pm 0,07$ | 4,30 $\pm 0,26$ |
| Versuch II | 7,31 $\pm 0,12$ | 4,05 $\pm 0,05$ | 4,63 $\pm 0,06$ | 5,11 $\pm 0,26$ |
| Versuch III | 4,62 $\pm 0,22$ | 4,02 $\pm 0,04$ | 5,56 $\pm 0,21$ | 5,12 $\pm 0,17$ |

Diese Aktivitäten wurden für die weiteren Berechnungen in den jeweiligen Studien benutzt.

3.2.2 *in vivo*-Untersuchungen

3.2.2.1 Versuchstiere

Für den Versuch I wurden 160 männliche B6D2F1-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) verwendet. Für die beiden anderen Versuche fanden, einschließlich der Vorversuche, 318 immundefiziente, weibliche Mäuse (Ncr, Taconic, Germantown, USA) Verwendung, da es sonst zu keinem Anwachsen der humanen Tumoren kommt. Bei den immundefizienten Mäusen handelt es sich um nude-Mäuse, die aufgrund eines Gendefektes keine reifen T-Zellen besitzen. Die B6D2F1-Mäuse wurden bei 20°C und die nude-Mäuse bei 25°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% in genormten Käfigen auf sterilisierter Einstreu (ssniff, Soest) gehalten. Sterilisiertes Futter (ssniff, Soest) und Wasser wurde ad libitum angeboten.

3.2.2.2 Pharmakokinetische Untersuchung der PMMA-Partikel an 3 Tumormodellen

Die Verteilung der PMMA-Partikel im Organismus wurde an tumortragenden Mäusen untersucht. Es kamen drei verschiedene Tumormodelle zum Einsatz, die sich in Aufbau, Wachstum und Lokalisation unterschieden und eine besondere Problematik (Inzidenzrate, Therapierbarkeit) in der humanen Krebstherapie (siehe Literaturübersicht) darstellen.:

Tab. 6: Überblick über die im experimentellen Teil der Arbeit verwendeten Tumoren

| Versuch | Tumorart | Herkunft | Charakterisierung | Autor |
|---------|------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------|
| I | murines Melanom (B16) | spontan, am Ohr einer C57B1/J6 Maus, seit 1979 in der AG „Exper. Pharmakol. u. Onkologie“ | melanotisches Melanom, solide | Geran et al., 1967 |
| II | humanes Mammakarzinom (MaTu) | Alter: 54 Geschlecht: weiblich Lokalisation:Milchgang, 1974 von ATCC erhalten | Milchgangskarzinom | Widmaier et al., 1974 |
| III | humanes Glioblastom (U-373) | Alter: 61 Jahre Geschlecht: männlich Lokalisation: temporal, seit 1979 in der AG „Exper. Pharmakol. und Onkologie“ | Glioblastoma multiforme (Grad IV) | Bigner, et al., 1981 |

Die für die pharmakokinetischen Untersuchungen der PMMA-Nanopartikel ausgewählten Tumormodelle lassen, aufgrund der deutliche Unterschiede zwischen den Tumoren, eine Aussage über die Einsatzmöglichkeit der Partikel als Arzneistoffträger in der Krebstherapie zu.

Das B16-Melanom wurde eingesetzt, weil es ein sehr schnell wachsender Tumor ist, der schon nach wenigen Tagen in die Lunge metastasiert. Der Primärtumor zeigt kein infiltratives Wachstum und ist in seiner makroskopischen Beschaffenheit weich bis brüchig (Geran et a., 1967). Beim Mammakarzinom handelt es sich dagegen um einen sehr derben, festen Tumor, der nur langsam wächst und keine Metastasen bildet. Das Glioblastommodell wurde etabliert, weil es nur in einem intrazerebralem Modell möglich ist die besondere Situation der Blut-Hirn- und Blut-Tumor-Schranke mit zu berücksichtigen. Es ist heute noch immer fast unmöglich einen Menschen oder ein Tier, der oder das an einem Glioblastom erkrankt ist, dauerhaft zu therapieren (siehe 2.2.1).

3.2.2.2.1 Aufbereitung der Tumorzellen für die Tierversuche

- murines Melanom (B16),
- humanes Mammakarzinom (MaTu),
- humanes Glioblastom (U-373) durchgeführt.

3.2.2.2.1.1 Präparation der B16-Melanomzellen

Die Zellen für diesen Versuch wurden aus einem *in vivo*-Tumor gewonnen. Die Tumorzellen wurden auf weiblichen C57BL- Mäusen kultiviert und nach 14tägigem Wachstum aus dem entstandenen Tumor isoliert. Der Tumor wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und fein mit einer Schere zerkleinert, durch ein Gazefilter gegeben und in HBSS suspendiert. Nach Anfärbung und Auszählung der Zellkonzentration wurde eine Zellzahl von 5×10^6 /ml eingestellt. Diese Zellsuspension (0,1ml) wurde in den linken Oberschenkelmuskel (Musculus biceps femoris) injiziert.

3.2.2.2.1.2 Präparation der MaTu-Zellen

Die humanen Mammakarzinomzellen der Linie MaTu wurden in RPMI-1640-Medium (Life Technologie, Grand Island, USA) mit 10% fötalem bovines Serum (RPMI/FBS) bei 37°C, 5%CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert.

Die Aufbereitung der Zellen erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Das alte Medium wurde entfernt und die Kulturflasche mit 6 ml PBS gespült.
- Es wurden 1,5 ml Trypsin-EDTA-Gemisch hinzugegeben und 3 min inkubiert.
- Durch die Zugabe von 6 ml RPMI/FBS wurde die Trypsinreaktion gestoppt und die gelösten Zellen resuspendiert.
- Um ein trypsinfreies Zellpellet zu erhalten, wurde 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert.
- Im Anschluß daran wurden die Zellen zweimal in 20 ml PBS gewaschen und jedesmal erneut zentrifugiert.
- Um die Anzahl der Zellen zu bestimmen, wurden die Tumorzellen mit Trypanblau versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Das Trypanblau färbt nur tote Zellen oder Zellen mit defekter Zellmembran an.
- Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt.
- Zur Einstellung der entsprechenden Zehlzahl wurde PBS verwendet.

Für den Tierversuch wurde eine Konzentration von 1×10^8 Zellen pro ml eingestellt. Jede Maus erhielt 0,1 ml dieser Zellsuspension s.c. in die rechte Flanke injiziert.

3.2.2.2.1.3 Präparation der Glioblastomzellen

Die humanen Zellen der Linien U-373, U-343, T15/96 und T23/96 wurden wie die MaTu-Zellen kultiviert und für den Einsatz am Tier vorbereitet. Die Konzentration wurde nach den Vorversuchen für U-373 auf $6,66 \times 10^7$ Zellen pro ml eingestellt, so daß sich im Injektionsvolumen (3µl) 2×10^5 Zellen befanden.

3.2.2.3 Vorversuche zum Glioblastommodell, einschließlich der Ergebnisse

Die Vorversuche dienten dazu, sinnvolle Rahmenbedingungen für den Hauptversuch festzulegen. Ziel war es, ein Gehirntumormodell zu entwickeln, das, so weit wie möglich, den Verhältnissen eines am Glioblastom erkrankten menschlichen Gehirns entspricht.

Um unter *in vivo*-Bedingungen ein Wachstum humaner Zellen (xenogenen Zellen) zu erreichen, wurden insgesamt 26 immundefiziente Mäuse (Ncr, nude/nude) eingesetzt. Die Tumorzellen wurden zu diesem Zweck in die rechte Hemisphäre des Großhirnes (Putamen) injiziert. Die Mäuse wurde mit Etomidat (Radenarkon, Astamedica, Frankfurt) mit einer Dosis von 40 mg/kg KG narkotisiert und in einem selbst konstruierten Fixierrahmen eingespannt. Nach der Eröffnung der Haut über dem Hirnschädel wurde mit einer Kanüle (23G, Terumo, Leuven, Belgien) ein Öffnung 3 mm lateral von der Medianebene auf dem Bregma (Knochnaht zwischen Os frontale und Os parietale) gebohrt. Durch dieses Bohrloch konnte dann eine 10 µl Injektionsspritze (Hamilton, Sigma, Göttingen) mit einer S26 Kanüle eingeführt werden. In einer Tiefe von 3 mm wurden die Tumorzellen appliziert. Im Anschluß an die Applikation wurde die Wunde mit Gewebekleber (Histoacryl, Braun, Melsungen) verschlossen. Bis zum Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere unter einer Rotlichtlampe vor Unterkühlung geschützt. Die Tiere begannen unmittelbar nach der Narkose mit der Futteraufnahme.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Auswahl einer geeigneten humanen Tumorzelllinie, die für die intrazerebrale Applikation in immundefiziente Mäuse geeignet ist,
2. erforderliche Tumorzellzahl,
3. Applikationsvolumen und -zeit,
4. Wachstumsdauer, ohne daß es zu einer Beeinträchtigung der Lebensqualität für das Versuchstier kommt.

1. Auswahl einer geeigneten Glioblastomzelllinie:

Folgende vier humane Glioblastomzelllinien (10^6 Zellen in $5\mu\text{l}$) wurden von in die rechte Gehirnhemisphäre von je 2 nude-Mäusen appliziert.

Tab. 7 : Übersicht über humane Glioblastomzellen, die auf ein intrazerebrales Wachstum in der Maus hin untersucht wurden

| Tumor | Herkunft | Charakterisierung | Autor |
|--------------|--|--------------------------------------|---|
| U-343 | Alter: 60 Jahre Geschlecht: männlich Lokalisation: - vom DKFZ - Heidelberg erhalten | Glioblastom (Grad III) | Westermark et al., 1973 |
| U-373 | Alter: 61 Jahre Geschlecht: männlich Lokalisation: temporal vom ATCC erhalten | Glioblastoma multiforme (Grad IV) | Bigner, et al., 1981 |
| T15/96 | Alter: 55 Jahre Geschlecht: - Lokalisation: rechts parietal von AG des MDC erhalten | Glioblastom (Grad -) | aus der Zellkultur von der Forschungsgruppe „Neurowissenschaften“ des MDC-Berlin erhalten, 1996 |
| T23/96 | Alter: 60 Jahre Geschlecht: - Lokalisation: rechts temporal von AG des MDC erhalten | Glioblastom (Grad -) | aus der Zellkultur von der Forschungsgruppe „Neurowissenschaften“ des MDC-Berlin erhalten, 1996 |

-: fehlende Informationen

Nur Zellen der Linie U-373 zeigten ein intrazerebrales Wachstum in der Maus. Der Tumor zeichnete sich durch ein stark infiltratives Wachstum (typisch für viele humane Glioblastome) aus. Da es zu einem gleichzeitigen s.c. Wachstum der U-373-Zellen kam, mußte in den anschließenden Vorversuchen die Zellzahl und das Injektionsvolumen festgelegt werden.

2. Festlegung der Tumorzellzahl:

In Anlehnung an Arbeiten von Altenschöpfer (1998) und Yoshida (1996) wurden im Versuch **A1** 1×10^4 Zellen und im Versuch **A2** 2×10^5 Zellen inokuliert. Es wurden 3 Zeitpunkte (14, 21, 28 Tage) mit je 3 Tieren pro Zeitpunkt festgelegt. Nach den jeweiligen Zeiten wurden dann die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Gehirne entnommen und zur weiteren Untersuchung in 2-Methylbutan (-40°C) schockgefroren.

Bei der mikroskopischen Untersuchung konnte bei Gruppe **A1** eine 60%-ige und bei **A2** eine 100%-ige Anwachsrate gefunden werden.

3. Volumen und Zeitdauer der Applikation:

Im vorangegangenen Versuch **A2** wurden die Zellen in einem Volumen von 3 μl (PBS) aufgenommen und über eine Zeit von 3 min appliziert. Auf Grund der Größe der Tumorzellen war es nicht möglich, eine größere Zellzahl in ein Volumen von 3 μl zu verbringen. Nach der Applikation der Zellen wurde die Injektionskanüle in 2 Teilschritten, je 1,5 mm/min, entfernt. Das Zurückziehen der Nadel erfolgte über eine Zeitdauer von 2 min, um eine Ausbreitung der Tumorzellen durch den Einstichkanal in andere Gewebe (Knochen, Haut) zu verhindern. Da es bei diesem Arbeitsablauf zu einem alleinigen Wachstum in der rechten Gehirnhemisphäre und zu keinen Zwischenfällen während der Applikation kam, wurden diese Parameter als geeignet befunden und keine weiteren Tierversuche zu dieser Fragestellung durchgeführt.

4. Wachstumsdauer:

Die aus Versuch **A2** gewonnen Tumorgößen sind in mm^3 zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten im Diagramm dargestellt.

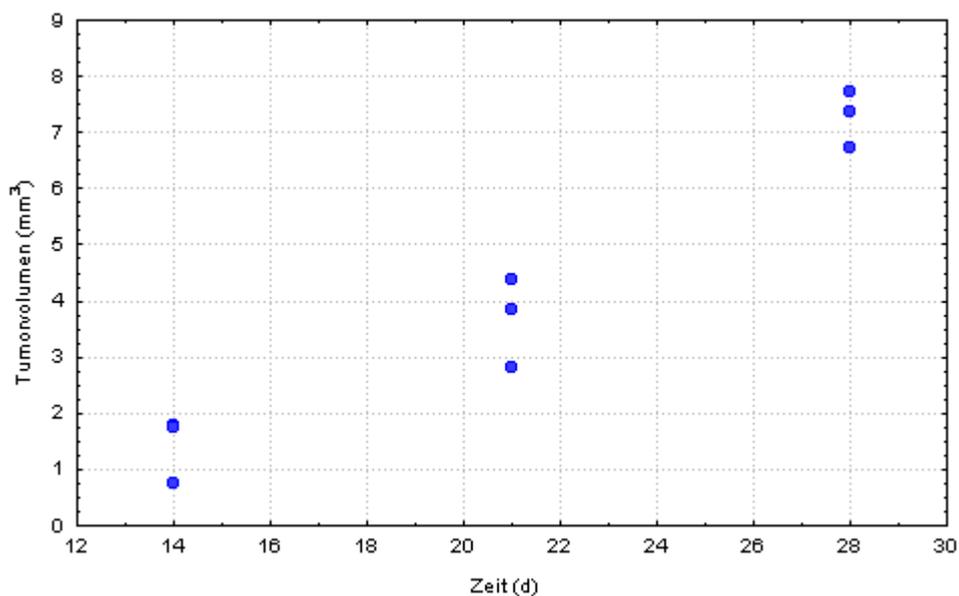


Abb. 4: Wachstumsintensität der Hirntumorzellen (U373), dargestellt als Tumorgößen (mm^3) der einzelnen Versuchstiere 14, 21 und 28 Tage (d) nach der intrazerebralen Inokulation

Die im Diagramm dargestellten Werte zeigen ein kontinuierliches Wachstum des Tumors über die Zeit. Die Tiere zeigten zu keinem Zeitpunkt Verhaltensänderungen, die auf einen Zusammenhang mit dem wachsenden Tumor hinweisen könnten.

3.2.2.4 Anfertigung der Gefrierschnitte

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden 36 und für die Versuche zum Glioblastommodell 390 Gefrierschnitte mit dem Kryostaten (CM3050, Leica, Nußlock) in einer Stärke von 5 µm angefertigt. Die Gehirne wurden nach der Entnahme aus dem Tier in 2-Methylbutan bei -40°C schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Im Kryostaten wurden die Organproben auf -20°C temperiert, dann auf einem Probenhalter mit Tissue-Tek (Plano, Wetzlar) fixiert und geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte vor der weiteren Bearbeitung luftgetrocknet.

3.2.2.5 Auswertung der Gehirnschnitte

Die Schnitte (390) wurden im Anschluß an die Lufttrocknung in einer 0,5% Kresylviolett-Lösung (Romeis, 1989) gefärbt und in der aufsteigenden Alkoholreihe bis Xylol entwässert und dann mit Eukit (Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckelt. Bei Kresylviolett (Merck, Darmstadt) handelt es sich um einen speziell die Zellkerne anfärbenden Farbstoff. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mittels histologischer Beurteilung unter dem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Jena) und Bestimmung der Tumorgößen mit einem computergestützten Auswertungsprogramm (NJH-Image/1,59/ppcAlias). Dazu wurden die Schnitte mit einem Durchlichtscanner (Sharp, JX-610, Japan) in den Computer eingescannt und die maximale Länge (L) und die Breite (B) des Tumors bestimmt. Mit Hilfe der in der Onkologie häufig verwendeten Sphäroidformel konnte das Tumolvolumen (V) ermittelt werden.

$$V = \frac{L \times (B)^2}{2}$$

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß nur die Glioblastomzelllinie U-373, bei einer Zellzahl von 2×10^5 in einem Volumen von 3 µl (PBS), ein intrazerebrales Wachstum (100%) zeigte. Die Applikation der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 3 min und das Zurückziehen der Injektionskanüle über 2 min. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt (14, 21, 28 d) wurden experimentell bedingte Verhaltensänderungen sichtbar.

3.2.2.6 Injektion der radioaktiven Nanopartikel

Für jede Präparation (A, B, C, D) und jeden Zeitpunkt (0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 8 h; 24 h; 72 h; 168 h) wurden in den Versuchen I und II 5 Tiere und nach Bekanntwerden der Empfehlungen von Newell und Hendriks (1998) für die Durchführung von pharmakokinetischen

Tierexperimenten zur Erprobung neuer Substanzen nur noch 4 Tiere verwendet. Die Mäuse erhielten je Versuch eine adäquate Menge Partikelsuspension (0,01ml/g KM) in die Schwanzvene injiziert. Die Injektionsgeschwindigkeit betrug 1ml/min. Die Injektion wurde mit einer 1 ml Spritze (Braun, Melsungen) und einer 25 G-Kanüle durchgeführt. Die Injektionsdosen betragen je nach Versuch :

Tab. 8: Dosis ($\mu\text{Ci/kg KM}$) der radioaktivmarkierten Injektionssuspensionen (A, B, C, D), angegeben als Mittelwert mit Standardabweichung

| Präparation | A [$\mu\text{Ci/kg KG}$] | B [$\mu\text{Ci/kg KG}$] | C [$\mu\text{Ci/kg KG}$] | D [$\mu\text{Ci/kg KG}$] |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Versuch I | 59,8 $\pm 0,12$ | 51,4 $\pm 0,84$ | 50,9 $\pm 0,75$ | 43,0 $\pm 2,67$ |
| Versuch II | 73,1 $\pm 1,18$ | 40,5 $\pm 0,52$ | 46,3 $\pm 0,61$ | 51,1 $\pm 2,62$ |
| Versuch III | 46,2 $\pm 2,22$ | 40,2 $\pm 0,36$ | 55,6 $\pm 2,13$ | 51,2 $\pm 1,67$ |

Unmittelbar vor jeder Applikation wurden die Partikel der Gruppe A einmal für 20s beschallt.

3.2.2.7 Organpräparation

Den 448 Tieren wurde zu den entsprechenden Zeitmeßpunkten 0,1 ml Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Im Anschluß daran wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Folgende Organe wurden nach Eröffnung der Brust- und Bauchhöhle herauspräpariert: Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz. Das Gehirn wurde aus der eröffneten Schädelhöhle entnommen. Das Knochenmark wurde durch Spülen mit 0,4 ml Natriumchloridlösung aus dem linken Os femoris gewonnen. Die Tumoren der Versuche I und II wurden aus dem umgebenden Gewebe herauspräpariert. Die Gesamtgewichte der entnommenen Organe und Tumoren wurden ermittelt und in Scintillationsröhrchen in einer durch den Probenaufbereitungsprozeß definierten Menge eingewogen. Da ein Herauspräparieren des Gehirntumors nicht möglich war, wurde im dritten Versuch die Aktivität sowohl in der linken tumorfreien als auch in der rechten tumortragenden Großhirnhemisphäre bestimmt. Die Injektionsstelle des Schwanzes wurde ebenfalls auf noch vorhandene Restradioaktivität geprüft, um eine genaue Bestimmung der injizierten Nanopartikelmenge vornehmen zu können. Alle Proben wurden im Gefrierschrank bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

3.2.2.8 Aufarbeitung der Organproben

Um die Radioaktivität in den Proben bestimmen zu können, wurden sie nach dem Auftauen mit 1 ml Gewebelöser (BTS-450, Beckman Instruments GmbH, München) versetzt. Die Proben wurden 1-2 Tage lang bei Raumtemperatur gelagert, bis die Organe vollständig aufgelöst waren. Danach erfolgte ein Zusatz von 0,1-0,3 ml H₂O₂ zur Entfärbung der Proben. Die Scintillationsröhrchen wurden dann mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit (Ready Organic Cocktail, Beckman Instruments GmbH, München) versetzt und nach einer zweiwöchigen Lagerung in Dunkelheit in einem Flüssigkeitsscintillationszähler (Packard, Groningen, Niederlande) vermessen. Während der Lagerung kam es zum vollständigen Abklingen der Chemolumineszenz.

3.2.2.9 Berechnung der Organaktivitäten

Die Berechnung der Radioaktivität als Maß für die Partikelkonzentration in den Organen und den Tumoren erfolgte nach Subtraktion der in der Injektionsstelle des Schwanzes zurückgebliebenen Aktivität. Es wurde für das Blut, die Organe und den Tumor die Verteilung der Partikel in Prozent der eingesetzten Menge angegeben. Um eine bessere Aussage über die Aufnahmefähigkeit der Gewebe und damit eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Geweben zu erreichen, wurden auch die Radioaktivitäten pro mg Organmasse umgerechnet als PMMA-Konzentrationen in ng pro mg Organmasse angegeben. Für die Bestimmung der Absolutwerte im Blut wurde ein Gesamtblutwert von 6,6 % der Körpermasse nach Angaben der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e.V. verwendet (Nicklas, 1995).

3.2.3 Statistische Bearbeitung der Daten

Die Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel 7.0 erfaßt, aufgearbeitet und die Körperverteilungen berechnet. Zur Statistischen Auswertung wurde die Programme SPSS und Statistica verwendet. Nach Beratung am Institut für Biometrie der Veterinärmedizinischen Fakultät der FU-Berlin wurden die Meßdaten auf ihre Verteilung hin untersucht, da diese nicht symmetrisch waren, wurde die weitere Bearbeitung unter Zuhilfenahme nichtparametrischer Verfahren vorgenommen. Für die ermittelten Organkonzentrationen (ng PMMA/mg Organmasse), hier nur angegeben als Medianwert mit 1. und 3. Quartil, wurde der Mann-Whitney-Test (Paarvergleich) für alle Präparationen, für jeden Zeitmeßpunkt durchgeführt. Die Beurteilung von 2 Präparationen als unterschiedlich erfolgte nur, wenn zu allen Zeitpunkten ein $p < 0,05$ vorlag.

Die Veränderungen der Körpergewichte im Verlauf der Versuche wurde mit Hilfe des nichtparametrischen Paarvergleiches nach Wilcoxon berechnet.

3.2.4 Charakterisierung der Blutwerte

Um das Verhalten der Partikelpräparationen im Blut besser untereinander vergleichen zu können, wurden für die 3 Versuche mit Hilfe des Pharmakokinetikprogramms TOPFIT 2.1 folgende Parameter berechnet:

- *Fläche unter der Kurve (AUC) / ng/ml*h,*
- *Clearance (C) / ml/min,*
- *Verteilungsvolumen (Vc) /ml.*

Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des III-Kompartimentmodells, da es die beste Anpassung an die experimentell ermittelten Werte ergab. Zusätzlich mußten die bestimmten Blutwerte manuell gefittet werden, um die Differenz zwischen den gemessenen und angepaßten Kurvenverläufen noch weiter zu verringern.

3.2.5 Untersuchung der Neoangiogenese der Tumormodelle

Um die in den Versuchen eingesetzten Tumoren (B16-Melanom, Glioblastom-U373, Mammakarzinom-MaTu) hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Neoangiogenese zu charakterisieren, wurden immunhistologische Färbungen durchgeführt. Dazu kamen ein Antikörper (VEGF(C-1) Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) gegen das Protein VEGF (vascular endothelial growth factor) und einer gegen dessen Rezeptor (FLK-1(A-3) Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) zum Einsatz. Es sollte sowohl untersucht werden, ob das Protein zur Induktion der Angiogenese im Tumor synthetisiert wurde und ob der entsprechende Rezeptor dafür vorhanden war. Beide Antikörper sind in der Lage, sowohl an humane als auch an murine Proteine oder Rezeptoren zu binden.

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach einem modifiziertem Protokoll (Junghahn) der Firma Santa Cruz. Alle Chemikalien, die nicht mit Hersteller und Ort beschriftet sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

- am Vortag angefertigte Gefrierschnitte wurden luftgetrocknet und im Kühlschrank bei 4°C gelagert,
- Fixierlösung I wurde auf die Schnitte aufgetropft und 15 min in einer Feuchtkammer auf dem Schüttler inkubiert,
- danach Objektträger mit NKH-Puffer spülen,

- zur Hemmung der endogenen Peroxidasen wurde 3% H₂O₂-Lösung aufgetropft und 5 min in einer Feuchtkammer auf dem Schüttler inkubiert,
- danach Objektträger mit NKH-Puffer spülen,
- zur Blockierung unspezifischer Proteine wurde anschließend NAK-Medium aufgetropft und 30 min in einer Feuchtkammer auf dem Schüttler inkubiert,
- Objektträger abklopfen,
- der 1:200 verdünnte Primärantikörper (Santa Cruz) wurde aufgetropft und 20 min in einer Feuchtkammer auf dem Schüttler inkubiert,
- zur Entfernung der nicht gebundenen Antikörper wurden die Objektträger zweimal in NKH-Puffer gewaschen,
- es wurden Biotin (LSAB-2Kit, K677, Dako, Hamburg) gekoppelte Sekundärantikörper (Anti-Ig-Maus-Biotin) aufgetropft und 10 min in einer Feuchtkammer auf dem Schüttler inkubiert,
- danach zweimal in NKH-Puffer gewaschen,
- Schnitte wurden mit an Streptavidin (Dako) gebundener Peroxidase überschichtet und 10 min in einer Feuchtkammer auf dem Schüttler inkubiert ,
- danach zweimal in NKH-Puffer gewaschen,
- Färbesubstrat AEC-(Aminoethylcarbazol)-Chromogen (Dako) wurde aufgetropft und 10 min in einer Feuchtkammer auf dem Schüttler inkubiert, positive Zellen zeigten eine Rotfärbung,
- nach erneutem zweimaligen Waschen in NKH-Lösung konnten die Schnitte 2 min mit Hämalaun gegengefärbt werden,
- im Anschluß daran wurden die Objektträger in 37 mM Ammoniak differenziert und mit wasserlöslicher Gelatinelösung eingedeckelt.

Die fertigen Schitte wurden lichtmikroskopisch (Axioskop, Zeiss, Jena) beurteilt. Da immunhistologische Schnitte nur semiquantitativ ausgewertet werden können, wurde zu diesem Zweck ein eigenes Schema entwickelt. Bei einer Vergrößerung von 1 x 400 wurden viermal 100 Zellen ausgezählt und die Anzahl angefärbter Zellen folgendermaßen bewertet.

Tab. 9: Symbolbedeutung der unter dem Lichtmikroskop gefundenen Anzahl von immunhistologisch angefärbten Zellen

| Anzahl der angefärbten Zellen | Symbol |
|-------------------------------|--------|
| 0 | - |
| 2-5 | + |
| 5-10 | ++ |
| 10-20 | +++ |

So ist es möglich, zwischen geringen und starken Anfärbungen zu unterscheiden, ohne auf die Absolutzahlen einzugehen, die sich zwischen den einzelnen Gesichtsfeldern etwas unterscheiden. Mit diesem Verfahren ist es nur möglich, eine grundsätzliche Aussage über die VEGF- und FLK-1-Expression zu treffen.

Neben den Gewebeschnitten wurden auch U-373 Zellen aus der Zellkultur auf die Expression des VEGF-Proteins untersucht. Die Zellen wurden dazu auf einem Objektträger angezüchtet und wie die Schnitte der Tumorgewebe nach dem oben beschriebenen Protokoll bearbeitet.