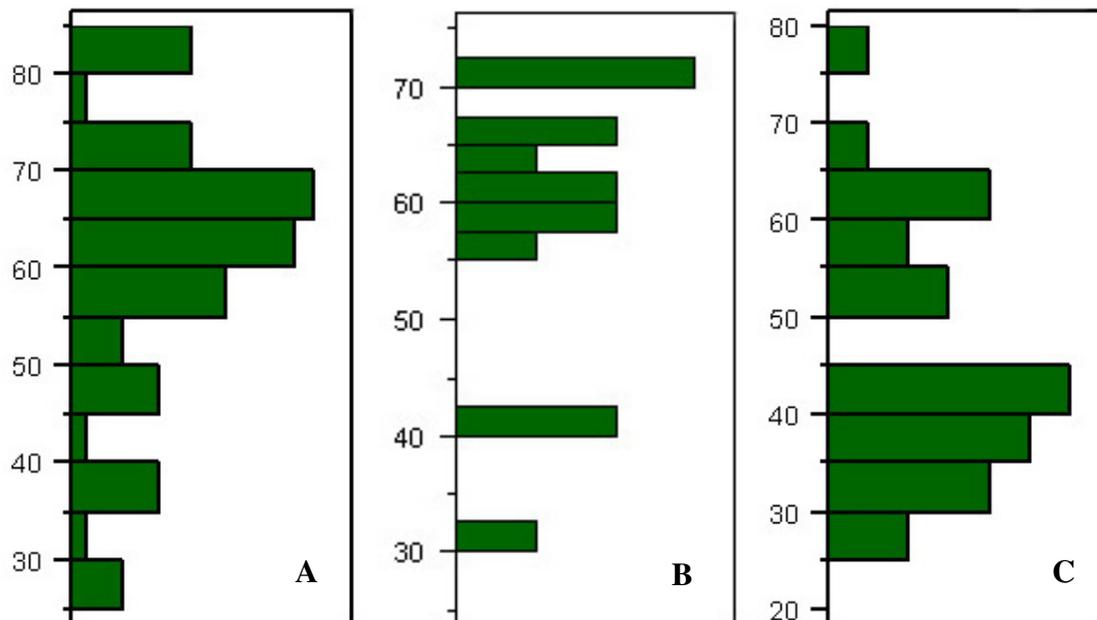


**3 Material und Methoden**

**3.1 Charakterisierung des Teilnehmerkollektivs**

**3.1.1 Altersstruktur**

Zur Bestimmung des Alters der Patienten wurden die zum Zeitpunkt der Diagnose vollendeten Lebensmonate herangezogen. Das Durchschnittsalter des Patientenkollektivs mit einer malignen Brustdrüsenerkrankung beträgt 60 Jahre, 58,3 Jahre in der Patientengruppe mit einer benignen Erkrankung der Brustdrüse und 45,6 Jahre in der Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt der Diagnose des Mammakarzinoms war die jüngste Patientin 35 Jahre und die älteste 81 Jahre alt. In der Gruppe der benignen Brustdrüsenerkrankungen war die jüngste Patientin 30 Jahre, die älteste 72 Jahre und in der Kontrollgruppe 25 bzw. 78 Jahre alt.



**Abb. 13: Altersverteilung**

A – Patientengruppe mit einer malignen Erkrankung der Brustdrüse

B – Patientengruppe mit einer benignen Erkrankung der Brustdrüse

C – Kontrollgruppe

**3.1.2 Patientinnen**

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 87 Frauen untersucht. Es wurde bei 47 stanzbioptisch gesicherten Mammakarzinom Patientinnen, bei 12 Patientinnen mit gutartigen Brustdrüsenerkrankungen sowie 28 gesunden weiblichen Probanden Blut entnommen.

<b>Charakteristika</b>	<b>Maligne Brustdrüsenerkrankung</b>	<b>Benigne Brustdrüsenerkrankung</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
<b>Anzahl</b>	47	12	28
<b>Alter, Jahre (± SE)</b>	60 ± 1,7	58,3 ± 3,3	45,6 ± 2,4
<b>Menopausenstatus Prä/ postmenopausal</b>	7/40	3/9	16/12
<b>Histologie</b>			
• <b>duktal</b>	40		
• <b>lobulär</b>	7		
• <b>Fibroadenom</b>		2	
• <b>Mastopathie</b>		9	
• <b>Papillom</b>		1	
<b>Größe</b>			
• <b>pTx</b>	1		
• <b>pT1</b>	17		
• <b>pT2</b>	21		
• <b>pT3</b>	5		
• <b>pT4</b>	3		
<b>Lymphknotenstatus</b>			
• <b>pNx</b>	4		
• <b>pN0</b>	22		
• <b>pN1</b>	21		
<b>Verlaufskontrollen</b>	8		
<b>2x</b>	4		
<b>3x</b>	3		
<b>4x</b>	1		

**Tab. 3: Charakteristika der Probanden**

Verlaufskontrollen:

Für die Untersuchung des postoperativen Verlaufes wurde bei 8 Frauen serielle Blutentnahmen durchgeführt. Der Abstand der Blutentnahmen war nicht streng vorgegeben, sondern richtete sich nach den Kontrolluntersuchungen.

### 3.1.3 Klinische und histologische Charakteristika der Karzinompatientinnen

<b>Alter bei Diagnose:</b>		60 ± 1,7 Jahre	
<b>Menopausenstatus:</b>	<b>prämenopausal</b>	7	14,9 %
	<b>postmenopausal</b>	40	85,1 %
<b>T-Stadium:</b>	<b>T x</b>	1	2,1 %
	<b>T 1</b>	17	36,2 %
	<b>T 2</b>	21	44,7 %
	<b>T 3</b>	5	10,6 %
	<b>T 4</b>	3	6,4 %
<b>Lymphknotenstatus:</b>	<b>N x</b>	4	8,5 %
	<b>N 0</b>	22	46,8 %
	<b>N 1</b>	21	44,7 %
<b>Histologischer Typ:</b>	<b>invasiv-duktral</b>	40	85,1 %
	<b>invasiv-lobulär</b>	7	14,9 %
<b>Östrogenrezeptor:</b>	<b>negativ</b>	7	14,9 %
	<b>positiv</b>	39	83 %
	<b>nicht bestimmt</b>	1	2,1 %
<b>Progesteronrezeptor:</b>	<b>negativ</b>	17	36,2 %
	<b>positiv</b>	29	61,7 %
	<b>nicht bestimmt</b>	1	2,1 %
<b>HER-2-neu Rezeptorstatus</b>	<b>Grad 1</b>	33	70,2 %
	<b>Grad 2</b>	2	4,3 %
	<b>Grad 3</b>	8	17 %
	<b>nicht bestimmt</b>	4	8,5 %

**Tab. 4: Klinische und histologische Charakteristika der 47 Karzinompatientinnen**

Als positiver Rezeptorstatus galten Werte ≥ 10 %.

### 3.2 Probengewinnung

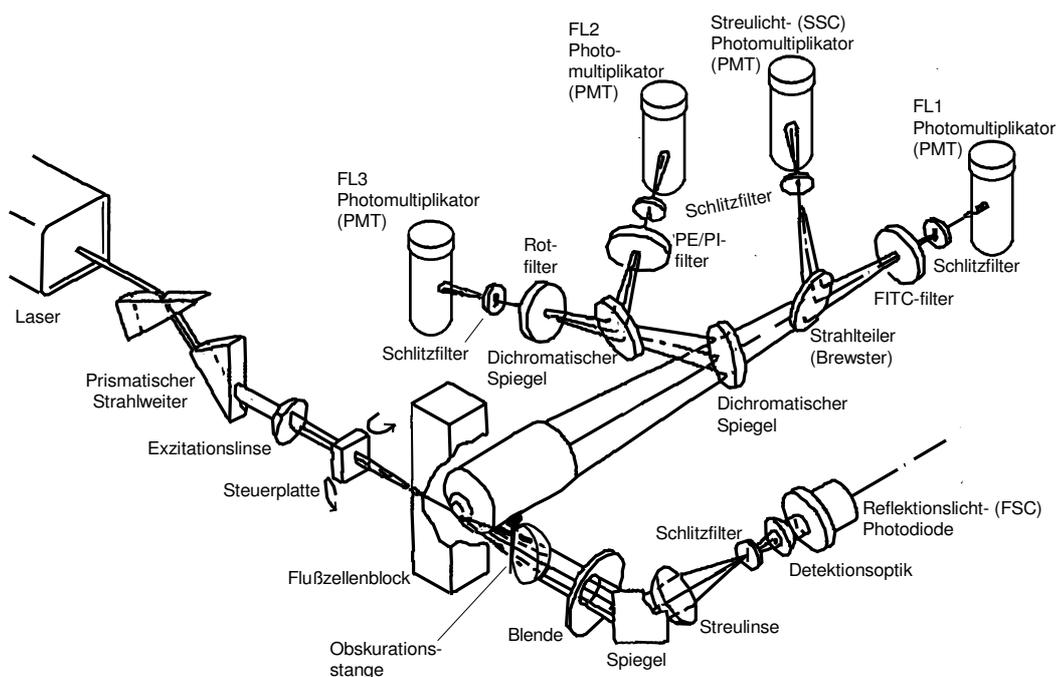
Zur Untersuchung der CD34/VEGFR2 Expression der mononukleären Zellen wurde den Patientinnen jeweils 4ml venöses Blut abgenommen, welches durch Zusatz von EDTA antikoaguliert wurde.

Für die Zellisolierung zur Bestimmung der CD133 Expression mittels magnetisch-konjugierter Beads sowie für die Anlage der Zellkulturen wurden jeweils 10ml heparinisiertes venöses Blut benötigt. Die Lagerung und der Transport der Proben erfolgte bei 4°C, die Verarbeitung innerhalb von 4 Stunden nach Entnahme. Alle Blutentnahmen wurden nach den Standardrichtlinien der Ethikkommission des Universitätsklinikums Benjamin Franklin behandelt.

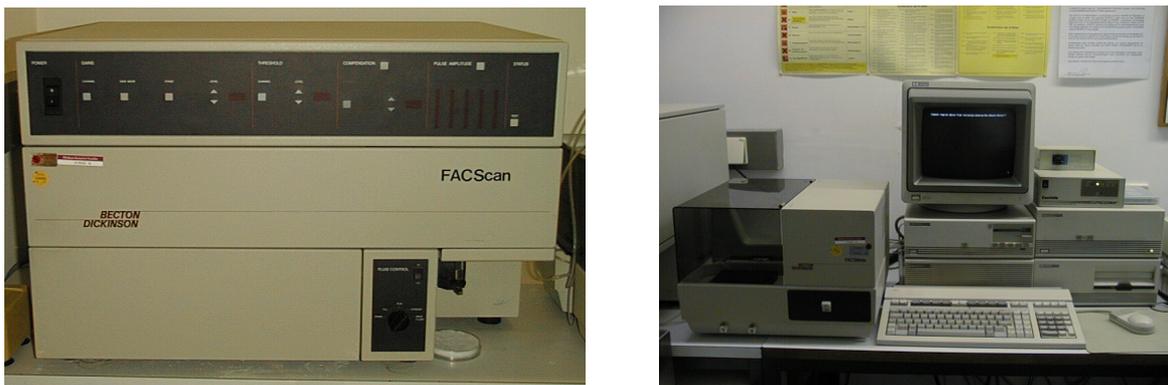
### 3.3 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie dient der quantitativen Analyse von Zellsuspensionen. Passieren die Zellen im Flüssigkeitsstrom den Lichtstrahl des Lasers, reflektieren bzw. emittieren die gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper Licht, das mit Hilfe zahlreicher Filter und Spiegel auf bestimmte Wellenlängen reduziert die Detektoren erreicht (Abb. 14).

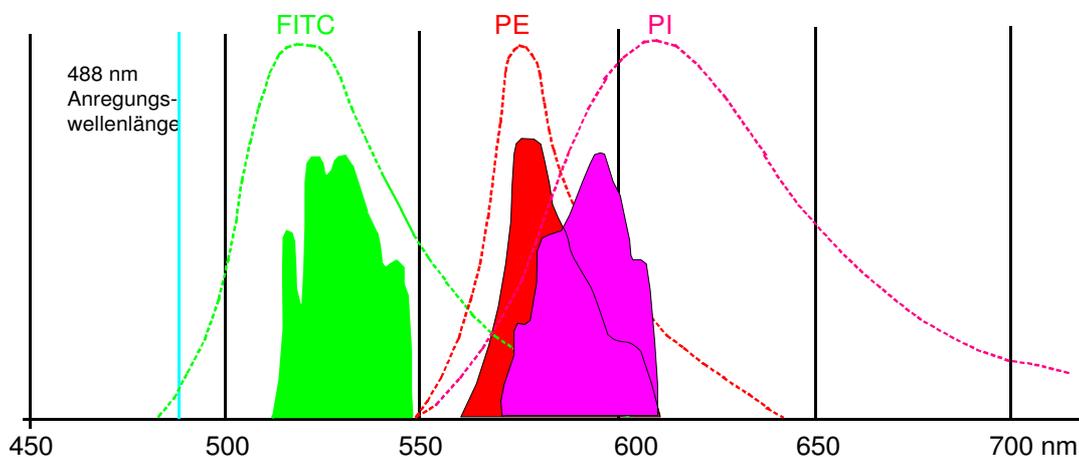
Das optische System eines Durchflußzytometers ist in der Lage, fünf Parameter der zu analysierenden Zellen zu erfassen. Zu den sog. intrinsischen Merkmalen gehören das Reflexionslicht (engl.: forward angle light scatter = FSC), dessen Quantität proportional zur Zellgröße ist und das Streulicht (engl.: side scatter = SSC), das Auskunft über die Granularität geben kann. Darüber hinaus ist es durch die Konjugation von Antikörpern mit bestimmten Fluorchromen möglich, extrinsische Eigenschaften der Zellen zu beschreiben, denn die emittierte Lichtmenge ist proportional zur Zahl der markierten Epitope. Das bedeutet, dass die Lichtemission um so höher wird, je dichter die entsprechenden Antigene exprimiert werden. Da die Farbstoffe über unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren verfügen (Abb. 16, Tab. 5), bietet sich die Möglichkeit, verschiedene Epitope einer Zelle gleichzeitig zu markieren. Diese Daten in Verbindung mit den Informationen des FSC und SSC erlauben nicht nur eine exakte Charakterisierung der untersuchten Zellpopulation, sondern auch eine Quantifizierung des Fluoreszenzsignals, das gleichbedeutend mit der Dichte der untersuchten Epitope ist.



**Abb. 14: Das optische System eines Durchflußzytometers**  
(aus: Einführung in die Durchflußzytometrie, Becton-Dickinson)



**Abb. 15: FACScan und FACSMate der Firma Becton-Dickinson**



**Abb. 16: Darstellung der Emissionsspektren der am häufigsten verwendeten Fluorochrome**

Die Wellenlängen des von ihnen emittierten Lichts unterscheiden sich so, dass für das Durchflusszytometer die Auftrennung der Signale möglich ist. Somit können in einer Analyse bis zu drei verschiedene Zellepitope markiert werden (aus: Einführung in die Durchflusszytometrie, Becton-Dickinson).

Farbstoff	Abkürzung	Anregungsmaximum	Emissionsmaximum
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	488 nm	530 nm
Propidiumiodid	PI	488 nm	620 nm
Phycoerithrin	PE	492 nm	580 nm

**Tab. 5: Farbstoffe mit Anwendung in der Durchflußzytometrie**

### **3.3.1 Darstellung der endothelialen Vorläuferzellen innerhalb der mononukleären Zellfraktion durch extrazelluläre Mehrfach-Markierung**

Die Darstellung der endothelialen Vorläuferzellen erfolgte durch Kombination eines CD34 (8G12) sowie eines monoklonalen Anti-VEGF Receptor-2 (KDR) Antikörpers.

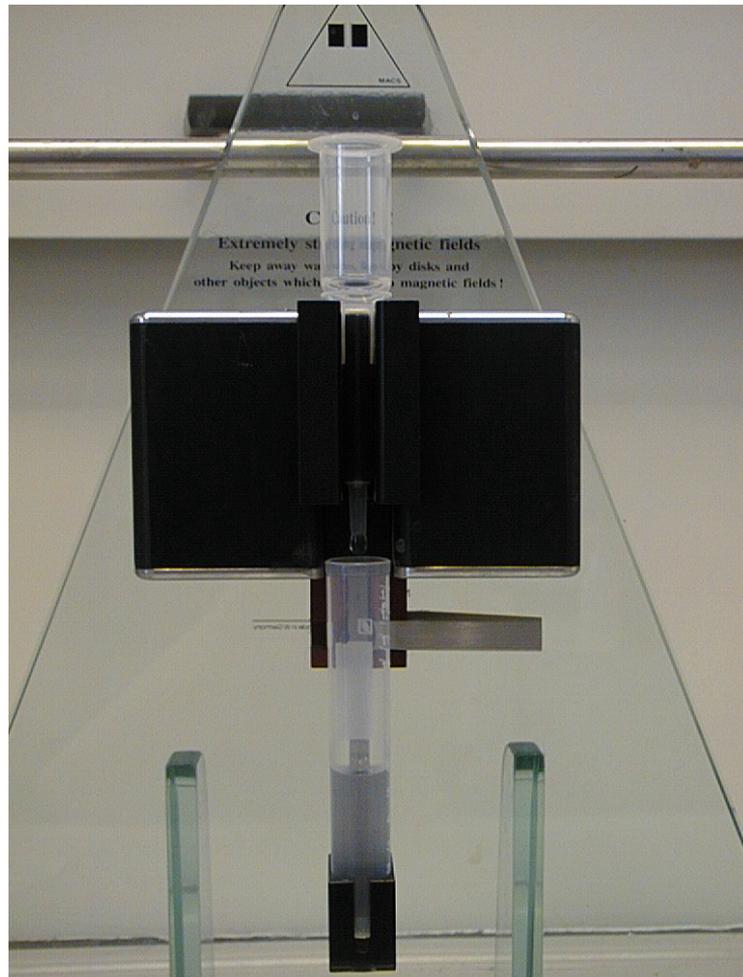
Die Markierung vollzog sich nach folgendem Protokoll:

1. 100µl EDTA-Vollblut wurden mit jeweils 100µl PBS verdünnt.
2. Der Ansatz wurde anschließend mit 2µl KDR (Clone KDR-1, Sigma) Antikörper versetzt und 20 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert.
3. Nach diesem Schritt erfolgte die Zugabe von 3µl des fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers (Goat Anti-Mouse Ig FITC, Becton-Dickinson) sowie des CD34 (PE-markiert, Becton-Dickinson) Antikörpers für weitere 20min Inkubationszeit bei Raumtemperatur in Dunkelheit.
4. Anschließend wurden die Erythrozyten durch Zusatz von 3ml Lysierungslösung (FACS Lysing Solution, Becton-Dickinson) der Probe entzogen. Die Einwirkzeit betrug zehn Minuten bei Raumtemperatur.
5. Beendet wurde die Lysierung mit 100µl Fixierung (Fixing Solution, Immunotech) pro Ansatz und Zentrifugation für 10min bei 300xg und Raumtemperatur.
6. Die flüssige Phase wurde durch Absaugen mit der Vakuumpumpe entfernt und der nachfolgende Waschschrift erfolgte durch Zufügen von 3ml PBS und Zentrifugation bei ebenfalls 300xg für 10min bei Raumtemperatur.
7. Nach der Zentrifugation und dem Absaugen des Überstandes wurde der Zellschlag in 300µl PBS resuspendiert.

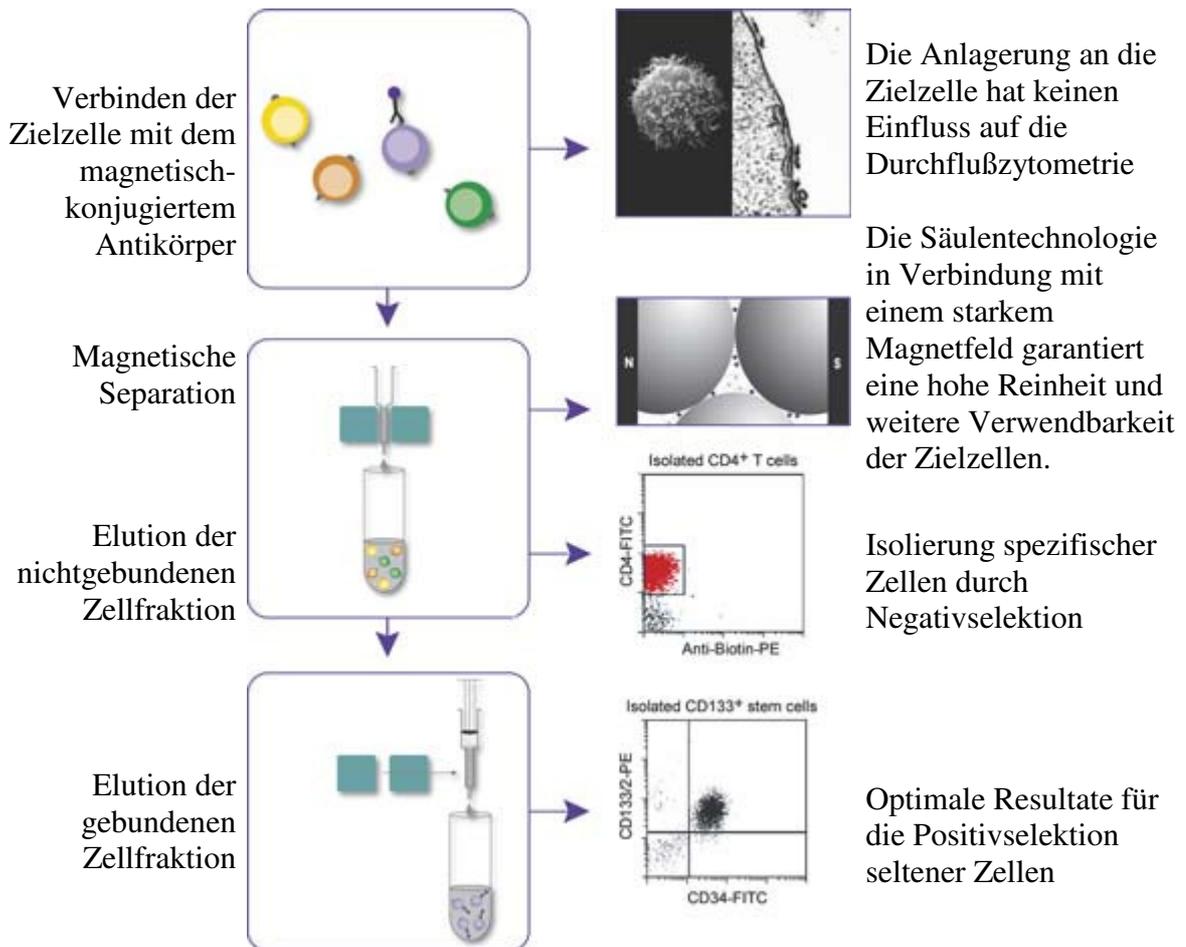
Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer Typ FACScan (Becton-Dickinson), die Bearbeitung der Daten zur Quantifizierung der Signalintensität mit Hilfe der Software "Win List" (Verity Software House).

### 3.4 Das MACS - System

Das Magnetic Activated Cell Sorting (MACS; Miltenyi Biotech GmbH, D) arbeitet mit submikroskopisch kleinen, super-paramagnetischen, antikörpergekoppelten Kügelchen, die keinen Einfluss auf die Funktionalität der Zellen haben (Schumm 1999). Das Zelleluat wird über eine Säule geleitet, die in einem Magneten eingespannt ist. Zellen, die mit dem Antikörper markiert wurden, werden von dem Magneten in der Säule zurückgehalten, die anderen Zellen fließen durch die Säule durch. Nach dieser Selektion wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die markierten Zellen mit einem Stempel und 5 ml Pufferlösung aus der Säule gedrückt. Bei dem vorliegendem Versuchsaufbau erfolgte die Selektion mit dem Antikörper für CD34 positive Zellen.



**Abb. 17: Der MACS Versuchsaufbau**



**Abb. 18: Prinzip der magnetischen Zellisolierung**  
(aus der MACS-Produktbeschreibung von Miltenyi Biotech)

### 3.4.1 Zellisolierung

Für die Isolierung mononukleärer Zellen wurde ein Verfahren verwandt, dessen Prinzip auf der Auftrennung des Vollblutes über einer geschichteten Flüssigkeitssäule aus Komponenten unterschiedlicher Dichte beruht. Da Antikörper der Firma Miltenyi verwendet wurden, wurde ebenfalls die von dieser Firma empfohlene Methode zur Zellisolierung verwendet.

Nachfolgend ist der experimentelle Ablauf dargestellt:

1. 10ml heparinisieretes Blut wurden mit 25ml PBS verdünnt und anschließend über 15ml Ficoll (Seromed, Dichte 1,077) aufgeschichtet.
2. Dann wurde für 30min bei Raumtemperatur und 400xg ohne Bremse zentrifugiert.

3. Nach der erfolgten Auftrennung wurde die Interphase, welche die Lymphozyten und Monozyten enthält, in ein neues 50ml Falcon-Tube überführt. Dieses wurde mit PBS aufgefüllt und für 10min bei 300xg und Raumtemperatur zentrifugiert.



**Abb. 19: Aufgetrenntes Vollblut nach der Zentrifugation**

4. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet resuspendiert. Die Probe wurde anschließend wieder mit PBS aufgefüllt und für 15min bei 200xg und Raumtemperatur zentrifugiert.
5. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt und anschließend der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 300µl PBS resuspendiert.

Hiermit ist die notwendige Isolation der mononukleären Zellen für den weiteren Versuchsaufbau abgeschlossen.

### **3.4.2 Verwendung des magnetisch konjugierten Antikörpers**

Für die durchgeführte Positivselektion wurde das CD34 MultiSort Kit von Miltenyi Biotec verwendet. Nachfolgend der Versuchsaufbau:

1. Zu der Zellsuspension wurden 100µl des im Kit enthaltenem FcR Blocking Reagens addiert um unspezifische Bindungen des CD34 Antikörpers zu verhindern sowie 100µl CD34 MicroBeads. Die Inkubation erfolgte 30min auf Eis.
2. Ein weiterer Waschvorgang mit 5ml MACS-Puffer und anschließender Zentrifugation für 15min bei 200xg folgte.
3. Das erhaltene Zellpellet wurde in 500µl MACS-Puffer resuspendiert.

### **3.4.3 Magnetische Separation mittels MACS**

Zuerst wurden die Säulen, in diesem Fall vom Typ MS<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec) vorbereitet, indem diese mit 3ml MACS-Puffer durchgespült wurden. Nachdem das geschehen war, wurde die Zellsuspension in die Säule gegeben. Dem folgten 3 Waschschrte mit jeweils 3ml MACS-Puffer. Jetzt wurde die Säule entnommen und die positive Fraktion wird mit 5ml MACS-Puffer aus dieser herausgespült und in einem neuem Falcon-Tube aufgefangen. Dann wurde bei 200xg für 15min zentrifugiert und anschließend das erhaltene Zellpellet in 100µl MACS-Puffer resuspendiert. Die so entstandene Zellsuspension kann jetzt mit einem 2. Antikörper versetzt werden.

### **3.4.4 Verwendung des 2. Antikörpers**

Als 2. Antikörper wurde ein CD133PE Antikörper der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Von diesem wurden 10µl in die Zellsuspension addiert und für 10min bei 4°C inkubiert. Jetzt folgte ein Waschschritt mit 2ml PBS und folgender Zentrifugation bei 300xg für 10min. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 300µl PBS resuspendiert. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer Typ FACScan (Becton-Dickinson), die Bearbeitung der Daten mit Hilfe der Software "Win List" (Verity Software House).

### **3.5 Isolierung und Kultivierung humaner endothelialer Vorläuferzellen**

Für die Kultivierung endothelialer Vorläuferzellen müssen die mononukleären Zellen der Blutprobe isoliert werden. Dazu wurde die Methode der Dichtegradienten wie beim Magnetic Activated Cell Sorting (3.4 MACS) verwendet. Auf der Basis der Expression des Oberflächenrezeptors CD34 lassen sich Vorläuferzellen durch Positivselektion mittels magnetisch konjugierter Antikörper separieren (siehe unter Punkt 3.4.2 und 3.4.3). Unter der weiteren Verwendung eines Mediums mit spezifischen Wachstumsfaktoren (EGM-2 BulletKit, Clonetics Inc., San Diego, California, USA) lassen sich diese Zellen kultivieren. Innerhalb der nächste 3-4 Wochen verlieren sie dabei ihre Vorläufereigenschaften und differenzieren zu Endothelzellen (Hristov 2003). Die Bearbeitung der Proben erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nachfolgend ist der Versuchsaufbau dargestellt:

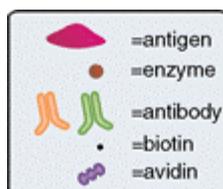
1. 15ml Ficoll (Seromed, Dichte 1,077) wurden in einem 50ml Falcon-Tube vorgelegt.
2. 10ml heparinisieretes Blut wurden 1:1 mit PBS verdünnt und anschließend über das Ficoll geschichtet.
3. Zentrifugation (40min, 300xg, RT, ohne Bremse)
4. In der Zwischenzeit wurde der Objektträger (Chamber Slide, Nunc Inc.) mit  $5\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Fibronectin (Sigma) beschichtet und mindestens 30min bei Raumtemperatur belassen.
5. Von der zentrifugierten Probe wurde die Interphase, in welcher sich die mononukleären Zellen befinden, entnommen und in ein neues 50ml Falcon-Tube überführt.
6. Dieses wurde mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (10min, 300xg, RT, mit Bremse).
7. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet mit PBS resuspendiert und anschließend das Röhrchen wieder aufgefüllt und für 15min bei 200xg und Raumtemperatur zentrifugiert..
8. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt und anschließend der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 300 $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert
9. Zu der Zellsuspension wurden 100 $\mu\text{l}$  des im CD34 MultiSort Kit (Miltenyi Biotech GmbH, D) enthaltenem FcR Blocking Reagens addiert um unspezifische Bindungen des CD34 Antikörpers zu verhindern sowie 100 $\mu\text{l}$  CD34 MicroBeads. Die Inkubation erfolgte 30min auf Eis.
10. Ein weiterer Waschvorgang mit 5ml MACS-Puffer und anschließender Zentrifugation für 15min bei 200xg folgte.
11. Die Fibronectin-Lösung wurde jetzt von dem Objektträger abgesaugt.

12. Das erhaltene Zellpellet wurde in 4ml Kulturmedium (EGM-2 BulletKit, Clonetics Inc., San Diego, California, USA) resuspendiert und auf den Objektträger überführt.

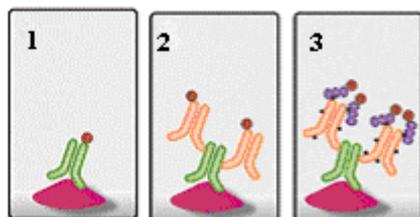
Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 2 Tage. Dabei wurde der Überstand entnommen, in ein 15ml Falcon-Tube überführt und zentrifugiert für 10min bei 300xg. Das erhaltene Zellpellet wurde in 4ml vorgewärmtes Kulturmedium resuspendiert und auf den Objektträger zurück überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für einen Zeitraum von 3 Wochen. Die adhärennten Zellen des Kulturansatzes entsprechen den aus Vorläuferzellen differenzierten Endothelzellen und können jetzt mittels Fluoreszenzfärbung und flowcytometrischer Bestimmung des vW-Faktors identifiziert werden.

### 3.6 Flowcytometrische Bestimmung des von Willebrand Faktors mittels der Biotin-Streptavidin-Methode

Zur Bestimmung der Identität und Reinheit der Zellkultur wurde der von Willebrand Faktor (Faktor VIII) als charakteristischer Marker für Endothelzellen verwendet. Zur Markierung wurde die Biotin-Streptavidin-Methode angewandt.



Anstelle von Avidin wurde in diesem Versuch Streptavidin verwendet. Streptavidin ist ein 60.000 Dalton Protein, bestehend aus 4 identischen Untereinheiten, von denen jede eine Bindungsstelle für Biotin besitzt. Trotz der geringeren Affinität gegenüber dem Biotin, im Vergleich zu Avidin, sind Konjugate der beiden Proteine in den meisten Applikationen gegeneinander austauschbar.



1. Andocken des primären Antikörpers gegen den von Willebrand Faktor
2. Andocken des sekundären, Biotin-gekoppelten Antikörpers
3. Verbinden des fluoreszenzkonjugiertem Streptavidins mit dem Biotin

**Abb. 20: Prinzip des Biotin-Streptavidin Systems**  
(aus Produktbeschreibung von Vector Laboratories)

Die adhärenen Zellen, der wie unter 3.5. beschriebenen, angelegten Zellkultur wurden vorsichtig mittels eines Zellschiebers gelöst und in 500µl PBS in Lösung gebracht. Der Ansatz wurde anschließend in ein Falcon-Tube überführt und folgendermaßen für die FACS-Analyse präpariert.

1. Zugabe von 10µl eines primären Antikörpers gegen vWF (Dako) und Inkubation für 20min bei 4°C.
2. Zugabe von 2,5µl Biotinylated rat anti-mouse IgG (Vector Laboratories Inc.) und Inkubation für 20min bei 4°C.
3. Zugabe von 2,5µl FITC-konjugiertem Streptavidin (Jackson Immuno Research Laboratories Inc.) und Inkubation für 20min bei 4°C.
4. Anschließend Hinzufügen von 2ml PBS und Zentrifugation (15min, 300xg, RT)
5. Vorsichtiges Absaugen des Überstandes und resuspendieren des erhaltenen Zellpellets in 300µl PBS.

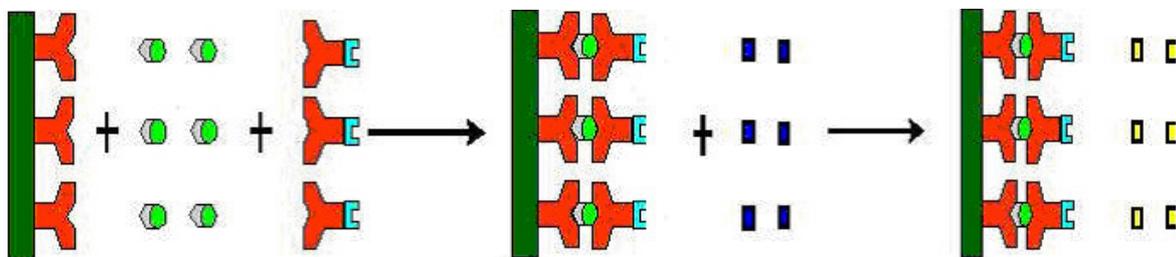
Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer Typ FACScan (Becton-Dickinson), die Bearbeitung der Daten mit Hilfe der Software "Win List" (Verity Software House).

### **3.7 Identifizierung von Endothelzellen durch die Aufnahme von Dil-Ac-LDL**

Endothelzellen können durch die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem acetyliertem low density lipoprotein (LDL) identifiziert werden. Die Aufnahme erfolgt endozytotisch über die LDL-Rezeptoren, wobei sich der Fluoreszenzfarbstoff in der intrazellulären Membran anhäuft. Als Farbstoff fungiert das Dil (1,1'-Dioctadecyl-1-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat). In den wie unter 3.5. beschriebenen, vorbereiteten Zellansatz wurden 10µl Dil-Ac-LDL (Harbor Bio-Products) pro ml Kulturmedium gegeben und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop gemacht.

### 3.8 Elisa (Enzymimmunoassay)

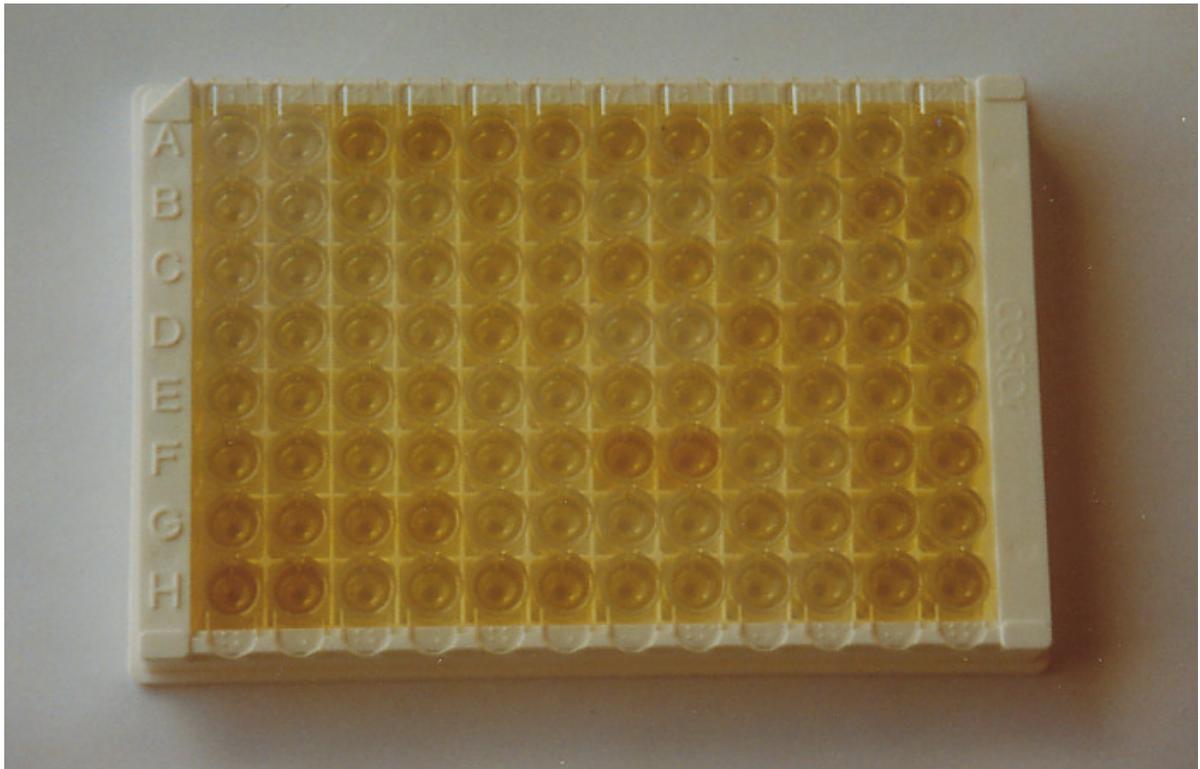
Die Elisa (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Technik basiert auf dem Antikörper-Sandwich-Prinzip. Man erfasst damit quantitativ Antigen- oder Antikörperkonzentrationen. Dabei werden Mikrotiterplatten mit einem gegen die zu bestimmende Substanz gerichteten mono- bzw. polyklonalen Antikörper (immunosorbent) beschichtet. Anschließend werden diesen Platten die Proben, Standards und Kontrollen zugegeben, wobei die zu bestimmende Substanz von den Antikörperen gebunden wird. Nach Inkubation und Waschschritten wird ein zweiter polyklonaler enzymgekoppelter Antikörper, der sogenannte Detektionsantikörper, zugegeben. Durch die wiederholten Waschvorgänge werden nicht hochaffin gebundene Proteine entfernt.



Antikörper + Antigen + enzymgekoppelter Antikörper → Sandwich-Komplex + Chromogenlösung → Farbreaktion

**Abb. 21: Prinzip Sandwich - ELISA**

Es folgt eine zweite Inkubation und weitere Waschvorgänge, nach welcher die Mikrotiterplatten mit einer Chromogenlösung beschichtet werden, die wiederum mit dem Enzym reagiert. Durch die Zugabe einer Säurelösung wird die Farbreaktion gestoppt und die Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen, wobei die Absorption der Konzentration der zu bestimmenden Substanz direkt proportional ist.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST 1	ST 1	Pat 1	Pat 9	Pat 17	Pat 25	Pat 33	Ko 1	Ko 9	Ko 17	Ko 25	Ko 33
B	ST 2	ST 2	Pat 2	Pat 10	Pat 18	Pat 26	Pat 34	Ko 2	Ko 10	Ko 18	Ko 26	Ko 34
C	ST 3	ST 3	Pat 3	Pat 11	Pat 19	Pat 27	Pat 35	Ko 3	Ko 11	Ko 19	Ko 27	Ko 35
D	ST 4	ST 4	Pat 4	Pat 12	Pat 20	Pat 28	Pat 36	Ko 4	Ko 12	Ko 20	Ko 28	Ko 36
E	ST 5	ST 5	Pat 5	Pat 13	Pat 21	Pat 29	Pat 37	Ko 5	Ko 13	Ko 21	Ko 29	Ko 37
F	ST 6	ST 6	Pat 6	Pat 14	Pat 22	Pat 30	Pat 38	Ko 6	Ko 14	Ko 22	Ko 30	Ko 38
G	ST 7	ST 7	Pat 7	Pat 15	Pat 23	Pat 31	Pat 39	Ko 7	Ko 15	Ko 23	Ko 31	Ko 39
H	ST 8	ST 8	Pat 8	Pat 16	Pat 24	Pat 32	Pat 40	Ko 8	Ko 16	Ko 24	Ko 32	Ko 40

**Abb. 22 und Tab. 6: Mikrotiterplatte und Bearbeitungsschema (Kontrollen [Ko], Standard [ST], Patientenmaterial [Pat])**

### 3.8.1 Quantitative Bestimmung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) im Serum

Verwendet wurde der Quantikine® Human VEGF Immunoassay der Firma R&D Systems, Minneapolis, USA. Die 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit einem polyklonalen VEGF-Antikörper beschichtet.

Durchführungsvorschrift:

1. Herstellen einer Standardreihe: Pipettieren von 500µl Standard (2000 pg/ml VEGF in Proteinpuffer) in 500µl Diluent (tierisches Serum) zum Verdünnen auf 1000 pg/ml, weiteres Verdünnen auf 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml und 31,2 pg/ml.
2. 100µl Assaypuffer ( Proteinpuffer [BSA]) in jede Vertiefung geben.
3. Pipettieren der VEGF-Standards 1-8 und des Probenmaterials in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Dabei je 100µl des Materials in die Vertiefung einbringen und für 2h bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Die Vertiefungen absaugen und 3x mit 400µl Waschlösung (gepufferte Surfactantlösung) waschen, auf Fließpapier trocken klopfen.
5. 200µl Antikörper-Enzym-Konjugat (an Meerrettichperoxidase [HRP] gekoppelte polyklonale VEGF-Antikörper) in jede Vertiefung geben, 2h bei Raumtemperatur inkubieren.
6. 3x mit 400µl Waschlösung waschen und auf Fließpapier trocken klopfen.
7. 200µl Chromogenlösung (Tetramethylbenzidin [TMB] mit Wasserstoffperoxid) in jede Vertiefung geben und für 25min bei Raumtemperatur inkubieren.
8. 50µl Stopplösung (2 N Schwefelsäure) in jede Vertiefung geben.
9. Absorption der Lösung nach 30min bei 450nm messen.

**Standards:** Rekombinantes humanes VEGF<sub>165</sub>

Mittelwert (pg/ml)	Streubreite (pg/ml)
220	62-707

**Tab. 7: Normalwerte des Herstellers:** n= 37 (keine Angaben zu Geschlecht und Alter)

**Sensitivität:** 9 pg/ml

	n	Mittelwert (pg/ml)	Variationskoeffizient V.K. (%)
Intra-Assay	20	235	4,5
Inter-Assay	40	250	7

**Tab. 8: Präzision VEGF-ELISA**

Quelle: R&D Systems Durchführungsvorschrift

### 3.8.2 Quantitative Bestimmung des basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) im Serum

Verwendet wurde der Quantikine® Human bFGF Immunoassay der Firma R&D Systems, Minneapolis, USA. Die 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind ebenso wie in dem vorangegangenen Versuch mit einem monoklonalen Antikörper, jetzt gegen bFGF, beschichtet.

Durchführungsvorschrift:

1. Herstellen einer Standardreihe: Pipettieren von 500µl Standard (2000 pg/ml bFGF in Proteinpuffer) in 500µl Diluent (tierisches Serum) zum Verdünnen auf 1000 pg/ml, weiteres Verdünnen auf 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml und 31,2 pg/ml.
2. 100µl Assaypuffer ( Proteinpuffer [BSA]) in jede Vertiefung geben.
3. Pipettieren der bFGF-Standards 1-8 und des Probenmaterials in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Dabei 150µl des Materials in die Vertiefung einbringen und für 3h bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Die Vertiefungen absaugen und 6x mit 400µl Waschlösung (gepufferte Surfactantlösung) waschen, auf Fließpapier trocken klopfen.
5. 200µl Antikörper-Enzym-Konjugat (an Alkalische Phosphatase gekoppelte monoklonale bFGF-Antikörper) in jede Vertiefung geben und 2h bei Raumtemperatur inkubieren.
6. 6x mit 400µl Waschlösung waschen und auf Fließpapier trocken klopfen.
7. 50µl Substratlösung (Lyophilized NADPH) in jede Vertiefung geben und für 45min bei Raumtemperatur inkubieren.

8. 50µl Verstärkerlösung (Lyophilized Enzyme) in jede Vertiefung geben und für 45min bei Raumtemperatur inkubieren.
9. 50µl Stopplösung (2 N Schwefelsäure) in jede Vertiefung geben.
10. Absorption der Lösung nach 30min bei 490nm messen.

**Standards:** Rekombinantes humanes bFGF

Mittelwert (pg/ml)	Streubreite (pg/ml)
2,21	ND-6,9

**Tab. 9: Normalwerte des Herstellers:** n= 65 (keine Angaben zu Geschlecht und Alter)

**Sensitivität:** 0,05 – 0,56 pg/ml

	n	Mittelwert (pg/ml)	Variationskoeffizient V.K. (%)
Intra-Assay	20	16,4	14,6
Inter-Assay	33	15	12,7

**Tab. 10: Präzision bFGF-ELISA**

Quelle: R&D Systems Durchführungsvorschrift

### 3.9 Statistik

Die erhobenen Daten wurden in eine Datenbank des Statistikprogramms JMP® eingegeben und mit dessen Hilfe numerisch und graphisch ausgewertet. Für jede Haupt- und Subgruppe wurden dabei der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwertes berechnet. Bei der Analyse der Datensätze wurden statistische Auswerteverfahren, wie der Wilcoxon-Rangsummentest, der Kruskal-Wallis Test, der t-Test sowie der  $\chi^2$ -Test angewandt. Die Analysen wurden jeweils für das Gesamtkollektiv der Patienten und für die betroffenen Unterkollektive durchgeführt. Zur Ermittlung von Zusammenhängen wurde der Spearmansche Rang-Korrelationskoeffizient bestimmt. Für alle durchgeführten Tests galt, dass eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0.05$  als statistisch signifikant bezeichnet wurde.