

4.4 Probenvorbereitung

4.4.1 Herkunft und Art der biologischen Proben

Alle analysierten Gewebeproben stammen von Patienten aus dem St. Cornelius Krankenhaus in Viersen. Nach der Operation der Patienten wurde ein Teil des entnommenen Gewebes zur pathologischen Untersuchung verwendet, der andere Teil wurde in Polyethylen (PE)-Folien bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren und gelagert. Die TRF-Analyse erfolgte innerhalb 3 Wochen nach Entnahme der Gewebeproben. Die Patientendaten sowie die pathologischen Berichte mit Angabe der genauen Entnahmestellen standen unter Einhaltung des Datenschutzes zur Verfügung.

In Abbildung 4.3 ist der menschliche Verdauungstrakt mit Magen, Kolon und Rektum dargestellt.

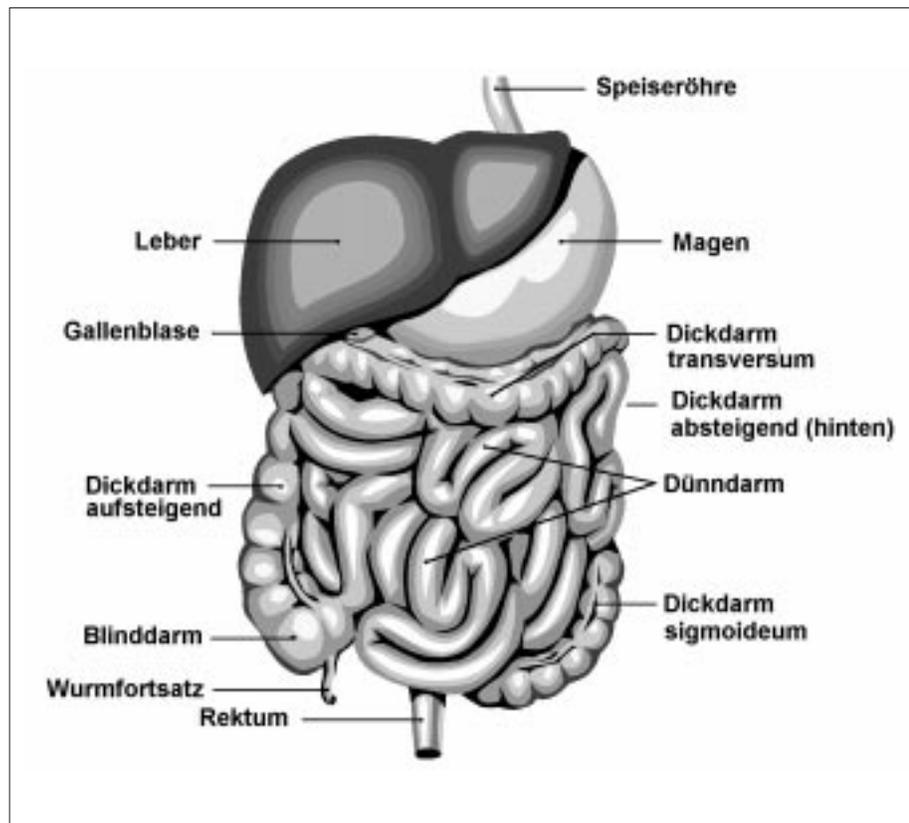


Abbildung 4.3: Vorderansicht des menschlichen Magen-Darm-Traktes

Der *Magen* steht am Anfang des Verdauungstraktes. Hier werden die zerkauten Speisen mit dem Magensaft gemischt, homogenisiert und in den sogenannten „Speisebrei“ (lat. Chymus) umgewandelt. Nach einer kürzeren oder längeren Verweildauer wird der Chymus in kleineren Portionen an den *Dünndarm* weitergegeben. Dem Dünndarm folgt der unterste Darmabschnitt, der *Dickdarm*. Dieser besteht aus dem Blinddarm (lat. Caecum), dem Grimmdarm (dem eigentlichen Dickdarm, lat. Kolon) und dem End- oder Mastdarm (lat. Rektum). Das als Kolon bezeichnete Teilstück wird seinerseits in einen aufsteigenden (lat. ascendens), querverlaufenden (lat. transversum), absteigenden (lat. descendens) und S-förmigen (lat. sigmoideum) Bereich unterteilt. Der gesamte Dickdarm hat eine Länge von ca. 1,5 m, wovon das Kolon (mit 6 - 8 cm Weite) 1,3 m und das Rektum etwa 10 - 20 cm einnimmt.

Die zur Verfügung gestellten Gewebeproben von Patienten des St. Cornelius Krankenhauses in Viersen wurden von den Ärzten mit fortlaufenden Probennummern versehen und sind in Tabelle 4.4 aufgelistet. Diese Nummerierung ist in der vorliegenden Arbeit beibehalten worden. Die ersten acht Proben (P1 - P8) wurden zur Optimierung des Aufschlußverfahrens unter realen Bedingungen verwendet. Alle nicht zu den drei Gewebearten Magen, Kolon und Rektum gehörenden Proben (P2, P6, P8 und P22) wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Probe P18 (Dünndarm) wurde den Dickdarmproben zugeordnet und mit ausgewertet.

Tabelle 4.4: Liste aller zur Verfügung gestellten Proben

Probennummer	Tag der Probennahme	Organ	Gewebeart ^a	Alter des/der Patienten/in	Geschlecht m / w ^b
1	20.03.1995	Kolon	n / t	53	w
2	27.03.1995	<i>großes Netz</i> ^c	n / t	58	w
3	30.03.1995	Kolon	n / t	67	m
4	18.04.1995	Kolon	n / t	72	m
5	19.04.1995	Kolon	n / t	79	m
6	27.04.1995	<i>Brust</i>	n / t	60	w
7	04.05.1995	Kolon	n / t	69	w
8	04.05.1995	<i>Prostata</i>	n / t	85	m
9	09.05.1995	Kolon	n / t	70	m
10	13.06.1995	Kolon	n / t	69	w
11	22.06.1995	Rektum	n / t	27	w
12	12.07.1995	Magen	n / t	86	w
13	26.08.1995	Magen	n / t	43	m
14	30.08.1995	Kolon	n / t	67	m
15	11.09.1995	Rektum	n / t	52	m
16	11.10.1995	Kolon	n / t	81	m
17	12.10.1995	Kolon	n / t	83	w
18	31.10.1995	<i>Dünndarm</i>	n / t	71	w
19	06.11.1995	Kolon	n / t	69	w
20	20.11.1995	Magen	n / t	76	m
21 ^d	20.11.1995	Kolon			
22	28.11.1995	<i>Brust</i>	n / t	72	w
23	12.12.1995	Rektum	n / t	67	w
24	26.01.1996	Rektum	n / t	64	m
25	29.01.1996	Magen	n / t	72	m
26	06.03.1996	Rektum	n / t	65	m

^aGewebeart: n = normales, t = tumoröses Gewebe^bm = männlich, w = weiblich^cGallenblasenmetastase^dDie Proben P20 und P21 stammen von demselben Patienten.

4.4.2 Durchführung des Druckaufschlusses

Der Probenaufschluß erfolgte in dem Autoklavensystem „MKP-01“ der Fa. ANCON-AT (Moskau). Pro Patientenprobe und Gewebearbeit (Tumor- und Normalgewebe) wurden zwei Aufschlüsse durchgeführt. Von jeder Probe wurde mit Hilfe eines Quarzmessers ein Teil des Gewebes excidiert. Die Gewebestücke hatten ein Gewicht von 300 - 400 mg Feuchtsubstanz und wurden in die PTFE-Reaktionsgefäße eingewogen. In einigen Fällen war die Gesamtmasse des Originalgewebestücks bereits vor Aufteilung in die zwei Aliquoten kleiner als 400 mg, sodaß die Masse des Aliquoten reduziert werden mußte (siehe z.B. Tab. A.3, Seite 132, Probe P16, Tumorgewebe).

Als Aufschlußreagenz wurde konzentrierte, durch Destillation unterhalb des Siedepunktes (subboiling) nachgereinigte Salpetersäure verwendet. Die optimale Menge der eingesetzten Säure wurde zuvor mit Hilfe zertifizierter, biologischer Referenzmaterialien (Schweineniere CRM 186, Rinderleber CRM 1577B) ermittelt. Als optimal erwies sich ein Säurevolumen von 3 mL für 200 mg eingesetzte Probe (Trockengewicht).

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Analyse wurden die zuvor genannten biologischen Referenzmaterialien aufgeschlossen und die Elementgehalte ermittelt. Die gemessenen Gehalte stimmten gut mit den Referenzgehalten überein [123]. Eine Ausnahme bilden lediglich die Elemente P, K, Cl und Pb. Phosphor und Kalium wiesen nur Wiederfindungsraten von 54% bzw. 74% auf. Ein Grund für diese schlechten Wiederfindungsraten ist der hohe Gehalt beider Elemente im Vergleich zum eingesetzten internen Standard. Die Gehalte des Elements Chlor in den Aufschlußlösungen der biologischen Referenzmaterialien lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze des Verfahrens. Sie sind darauf zurückzuführen, daß das im Gewebe befindliche Chlor ganz oder teilweise durch Redoxprozesse während des Aufschlusses in elementares Chlor überführt wurde und dieses während des Eindampfens der Aufschlußlösung auf den Probenträger entwichen ist [52, 110, 111].

Zur Quantifizierung der Elementgehalte wurden den Gewebeproben vor dem Aufschluß definierte Mengen Yttrium- und Tellurlösungen als interne Standards zugesetzt. Die Auswahl der Standards erfolgte durch Analyse der Spektren der aufgeschlossenen Gewebeproben (P1 - P8): Die Spektren wurden auf Anwesenheit von Y und Te überprüft. Da die beiden Elemente in den analysierten Proben nicht nachweisbar waren, wurden sie als interne Standards ausgewählt.

Die Reaktionsgefäße wurden anschließend in die Druckbomben des Autoklavensystems überführt und mit Hilfe des Heizblocks temperiert. Die Aufschlußtemperatur betrug 180 °C, die Aufschlußzeit 2 Stunden. Danach wurden die Druckgefäße abgekühlt und vorsichtig geöffnet, sodaß nitrose Gase entweichen konnten.

Unter den genannten Reaktionsbedingungen konnten alle Gewebeproben zu klaren, gelblich angefärbten Lösungen aufgeschlossen werden. Zur Bestimmung des Blindwertes wurden je zweimal 3 mL HNO₃-Lösung mit 35 µL Y- und Te-Standard (Konzentration jeweils $c = 1$ g/L) versetzt und dem Aufschlußprogramm unterzogen. Die Tabellen A.2 - A.5 im Anhang (Seite 131 bis 134) zeigen die Einwaagen der aufgeschlossenen Magen-, Kolon- und Rektumproben und die zugesetzten Volumina und entsprechenden Konzentrationen der verwendeten internen Standards Yttrium und Tellur.

4.4.3 Präparation der Probenträger

Von jeder aufgeschlossenen Probenlösung wurden 4 Aliquote von je $30 \mu\text{L}$ auf die Mitte der silikonisierten und mit 2%-iger Flußsäurelösung präparierten Probenträger aufgebracht und auf der Ceranfeld-Heizplatte (Stufe 1, $T = 80^\circ\text{C}$) 30 Minuten bis zur Trockene eingengt. Die Behandlung der Probenträger mit 2%-iger Flußsäurelösung hat eine bessere Ausbreitung des Lösungstropfens ($30 \mu\text{L}$) auf der silikonfreien Zone des Probenträgers zur Folge. Besonders bei der Analyse von Gewebeproben wird während des Trocknungsvorgangs ein für die nachfolgende TRF-Messung vorteilhafter ebener Rückstand erhalten (siehe Abbildung 4.4). Im Vergleich mit den eingetrockneten Rückständen ohne HF-behandelte Oberfläche kann die Streuung der Röntgenprimärstrahlung, die jede TRF-Messung stört, erheblich verringert werden.¹ Eine ausführliche Beschreibung des Präparationsvorganges beschreibt MÜLLER [105].

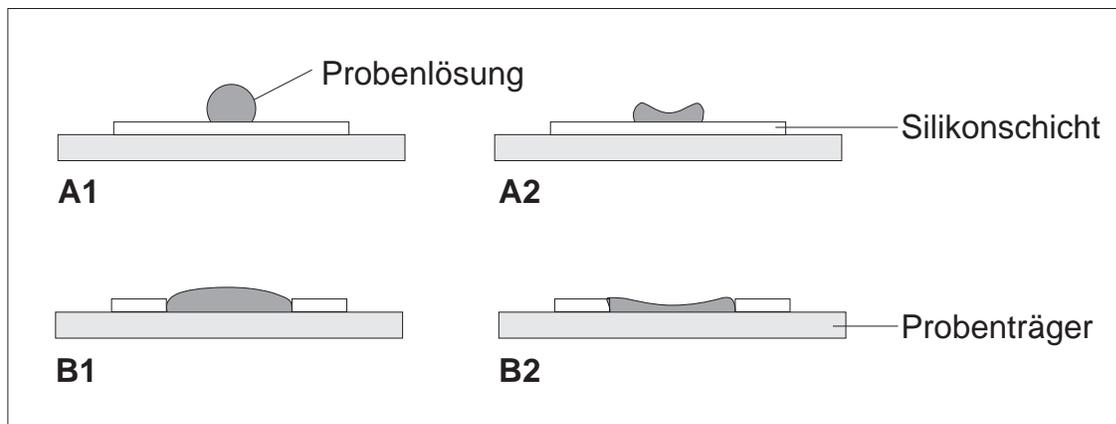


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Probenaufgabe auf einen Quarzglasprobenträger, A1,B1: Lösung vor Trocknen, A2,B2: Rückstand nach dem Trocknen, B1/B2: Mit HF-Lösung angeätzter Probenträger

¹Persönliche Mitteilung: TRFA-Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kolbesen, Universität Frankfurt am Main