

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Juli 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/055680 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/15055

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Dezember 2001 (20.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 01 319.1 9. Januar 2001 (09.01.2001) DE

CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US*): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
[DE/DE]; Frau Dr. Kirsch, Corporate Patents, Müllerstr.
178, 13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): SCHMIDT, Carolin
[DE/DE]; Wankstr. 16, 12107 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: MORPHOMETRIC TISSUE OR CELL PREPARATION

(54) Bezeichnung: MORPHOMETRISCHES GEWEBE- ODER ZELLPRÄPARAT

(57) Abstract: The invention relates to a morphometric tissue or cell preparation, which may be obtained by carrying out the following method steps: a) cells are cultivated in a three-dimensional matrix, over a defined time and under defined conditions, b) after the defined time, the matrix containing the cultivated cells or tissue is incubated with a fixing and staining solution containing an aldehyde and a non-antigen-specific stain.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat welches erhältlich ist, indem die folgenden Verfahrenstufen ausgeführt werden: a) Zellen oder Gewebe werden über eine definierte Zeit unter definierten Bedingungen in einer dreidimensionalen Matrix kultiviert, b) nach Ablauf der definierten Zeit wird die die kultivierten Zellen oder Gewebe enthaltende Matrix mit einer Fixier- und Färbelösung enthaltend ein Aldehyd sowie ein antigenunspezifisches Färbemittel inkubiert.



WO 02/055680 A2

Morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat, welches erhältlich ist, indem die folgenden Verfahrenstufen ausgeführt werden: a) Zellen oder Gewebe werden über eine definierte Zeit unter
10 definierten Bedingungen in einer Matrix kultiviert, b) nach Ablauf der definierten Zeit wird die die kultivierten Zellen oder Gewebe enthaltende Matrix mit einer Färbelösung inkubiert. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Herstellungsverfahren für ein solches
15 Präparat sowie Verwendungen desselben. Die Erfindung betrifft schließlich eine Fixier- und Färbelösung zur Verwendung in einem solchen Verfahren.

Ein morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat ist in
20 einer Weise behandelt, die eine Erkennung der Formbildung (Morphogenese) zellulärer Strukturen bzw. von Gewebestrukturen erlaubt. Hierbei ist es wesentlich, daß Formen, beispielsweise Formen von Zellen und/oder Zellbestandteilen und/oder Geweben,
25 mittels kontrastbildender Methoden erkennbar gemacht werden. Eine Erkennung kann dabei durch Betrachtung unter Verwendung diverser optischer Methoden, im einfachsten Falle mittels normaler Lichtmikroskopie, erfolgen. Oft erfolgt im Rahmen der Erkennung eine
30 Zählung von bestimmten Formmerkmalen, welche meist mit bestimmten zellulären Prozessen korreliert sind. Die Erkennung kann visuell durch das menschliche Auge erfolgen, wobei dann eine betrachtende Person beispielsweise die Identifizierung gesuchter
35 Strukturen und ggf. deren Zählung anhand der Betrachtung des Präparats, ggf. durch ein Mikroskop, oder durch Betrachtung einer entsprechenden Aufnahme durchführt. Einfacher und sicherer ist es jedoch, die

-2-

Erkennung zu automatisieren, beispielsweise durch Aufnahme des (Mikroskop-) Bildes und Auswertung mittels eines computergesteuerten Mustererkennungssystems, welches dann auch automatisch eine Zählung durchführen kann. Eine Aufnahme kann photographisch oder elektronisch, beispielsweise mittels CCD Elementen, durchgeführt werden. Die Methodik dient dazu festzustellen, welchen Einfluß die definierten Kultivierungsbedingungen auf die Morphogenese haben. Der Ausdruck der definierten Kultivierungsbedingungen umfaßt daher insbesondere auch nicht-natürliche bzw. nicht-Standard-Bedingungen, welche beispielsweise durch Zugabe eines oder mehrerer prospektiver Wirkstoffe zu einem Standardmedium charakterisiert sind. Es versteht sich, daß die Bedingungen in jedem Fall so zu wählen sind, daß nicht praktisch sofortige Apoptose aller Zellen des Präparats insgesamt induziert wird. Die Färbelösung dient dazu, die Formgebungsmerkmale von Interesse im Kontrast hervorzuheben. Den Farbstoff kann der Durchschnittsfachmann unschwer nach Maßgabe der interessierenden Formen auswählen (beispielsweise basische Farbstoffe binden an saure Zellstrukturen, wie DNA im Kern oder RNA in den Ribosomen; saure Farbstoffe binden bevorzugt an basische Plasmaproteine). Wesentlich bei der Färbung ist, daß der Farbstoff an (bestimmte) zelluläre Strukturen so fest gebunden wird, daß eventuelle subsequente Waschverfahrenstufen den Farbstoff nicht mehr abzulösen vermögen. Die Bindungsstellen des Farbstoffes bilden dann die gefärbten Bereiche, während Bereiche, in welchen keine oder weniger Bindungsstellen für den Farbstoff vorliegen, nicht oder nur schwach gefärbte Bereiche darstellen. Dies ist letztendlich der Mechanismus der Kontrastbildung.

Ein Verfahren der eingangs genannten Art ist beispielsweise aus der Literaturstelle Leclere, P.,

Neuroscience:82, 545-548, 1998, bekannt. Bei dem
insofern bekannten Verfahren wurden
Ganglienzellenexplantate mit Nervenwachstumsfaktor
behandelt bzw. in dessen Gegenwart kultiviert und
5 anschließend wurde das dadurch induzierte
Neuritenwachstum morphometrisch analysiert. Dabei
wurde eine Färbung unter Einsatz von
farbstoffmarkierbaren bzw. farbstoffmarkierten
Antikörpern durchgeführt. Es handelt sich folglich um
10 eine Antigen-abhängige Färbemethode. Spezifische
Färbungen dieser Art sind jedoch nur für recht dünne
Matrices geeignet. Oft ist es jedoch wünschenswert,
ausgeprägt dreidimensionale Matrices bzw. Kulturen zu
verwenden, wobei dann eine ausreichend homogene
15 Antigen-abhängige Färbung nur schwer oder gar nicht
gelingt. Zudem sind Antigen-abhängige Färbemethoden
zeitaufwendig und kostspielig.

Aus den Literaturstellen Hayakawa, K., et al.,
20 Neurosci Lett.:274, 103-106, 1999, und Carreau, A.,
Neuropharmacology:36, 1755-1762, 1997, ist es bekannt,
morphometrische Analysen mittels der
Phasenkontrastmikroskopie in-situ, i.e. in unfixiertem
Zustand, durchzuführen. Die Aufnahmen sind jedoch
25 sehr kontrastarm, was insbesondere eine automatische
Mustererkennung erschwert, wenn nicht unmöglich macht.
Zudem können die Kulturen dabei sehr schnell
degenerieren. Im Falle der erstgenannten
Literaturstelle ist das Auswandern von Zellen aus
30 komplexen Geweben, wie z. B. bei der Metastasierung
von Tumoren untersucht. Die zweitgenannte
Literaturstelle beschreibt den Einfluß von
Nervenwachstumsfaktoren auf das Neuritenwachstum.

35 Demgegenüber liegt der Erfindung das technische
Problem zugrunde, ein morphometrisches Gewebe- oder
Zellpräparat anzugeben, welches eine stabile und
dauerhafte morphogenetische Momentaufnahme darstellt

-4-

und gleichzeitig einfach herstellbar ist bei sehr guter Kontrastbildung.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die
5 Erfindung ein morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat, welches erhältlich ist, indem die folgenden Verfahrenstufen ausgeführt werden: a) Zellen oder Gewebe werden über eine definierte Zeit unter definierten Bedingungen in einer dreidimensionalen
10 Matrix kultiviert, b) nach Ablauf der definierten Zeit wird die die kultivierten Zellen oder Gewebe enthaltende Matrix mit einer Fixier- und Färbelösung enthaltend ein Aldehyd und, optional einen Alkohol, sowie ein antigenunspezifisches Färbemittel inkubiert.
15 Hieran kann sich eine Waschverfahrensstufe, beispielsweise mit Wasser, anschließen. Ein antigenunspezifisches Färbemittel ist ein Farbstoff, welcher allein aufgrund seiner sauren oder basischen Gruppen, aber auch durch Redox-Prozesse, unspezifisch an
20 Moleküle bzw. Molekülklassen einer Zelle oder eines Gewebes binden kann. Es kann auch eine Bindung an praktisch alle Strukturen von Zellen oder eines Gewebes stattfinden. Ein Einsatz von Antikörpern findet nicht statt. Das Aldehyd und ggf. der Alkohol
25 bewirken eine zuverlässige Fixierung von Strukturen der Zellen oder des Gewebes durch eine Vielfalt von immobilisierenden Reaktionen mit an sich mobilen Molekülen der Zellen oder des Gewebes, beispielsweise im Wege von Mannich Reaktionen. In einer
30 dreidimensionalen Matrix erfolgt Zellwachstum bzw. Wachstum von Zellteilen in allen drei Raumrichtungen. Insbesondere sind hierunter Präparate zu verstehen, deren räumliche Ausdehnung in allen drei Raumrichtungen ein Mehrfaches der räumlichen
35 Ausdehnung der kultivierten Zellen ist, beispielsweise gleich oder mehr als das 2-fache, vorzugsweise mehr als das 10-fache, bis zu mehr als das 100-fache. Mit der Erfindung wird erreicht, daß das ausgeprägt

dreidimensionale Zell- oder Gewebepräparate stabil und dauerhaft fixiert sind und zugleich mittels einfachster Methoden, beispielsweise einfacher Lichtmikroskopie, sehr kontrastreiche Aufnahmen erhalten werden. Dabei ist nur eine einzige Behandlung mit der Fixier- und Färbelösung notwendig, i.e. es handelt sich um eine "one-step"-Methode. Zudem lassen sich ausgeprägt dreidimensionale Präparate gut fixieren und färben, während eine spezifische Färbung solcher Präparate mit Antikörper-basierenden Methoden kaum, wenn überhaupt, gelingt. Ausgeprägt dreidimensionale Präparate sind solche, die nicht lediglich eine minimale Dicke aufweisen (Schnitte), sondern Dicken von durchaus 0,2 μm bis hin zu 20 mm, insbesondere 0,2 mm bis 20 mm, aufweisen können.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, welche von selbstständiger Bedeutung ist, enthält die Fixier- und Färbelösung Wasser, optional ein mit Wasser mischbares organisches Lösemittel, und Kochsalz. Die wäßrige Kochsalzlösung, insbesondere im Falle einer physiologischen Kochsalzlösung, verhindert zuverlässig Formänderungen von Zellen oder Gewebe, beispielsweise osmosebedingt, im Zuge der Fixierung und Färbung.

Im Einzelnen kann die Fixier- und Färbelösung die folgenden Komponenten enthalten: A) 0,5 - 35 Gew.-%, vorzugsweise 1 - 2 Gew.-%, Aldehyd, B) 0,01 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise 0,3 - 0,6 Gew.-%, Färbemittel, C) 0 - 90 Gew.-%, vorzugsweise 30 - 50 Gew.-%, eines oder mehrerer mit Wasser mischbaren organischen Lösemittel, D) 0 - 90 Gew.-%, vorzugsweise 50 - 70 Gew.-%, Wasser, E) 0 - 5 Gew.-%, vorzugsweise 0,1 - 1 Gew.-%, Kochsalz, wobei die Summe der Anteile der Komponenten A) bis E) stets 100 Gew.-% ergibt, und wobei das Verhältnis der Gewichtsanteile der Komponenten E : D in dem Bereich von 1 : 1000 bis 1 : 100 liegt,

vorzugsweise dem Verhältnis der Gewichtsanteile einer physiologischen Kochsalzlösung entspricht. Die Erfindung betrifft auch selbstständig eine solche Fixier- und Färbelösung.

5

Die Dauer der Inkubation in Stufe b) kann im Bereich von 0,5 bis 24 h, vorzugsweise im Bereich von 1 bis 10 min., betragen. Die Inkubation in Stufe b) kann bei einer Temperatur von 0 °C bis 60 °C, vorzugsweise von 10 0 °C bis 40 °C, durchgeführt werden.

Das mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus "C1-10 Alkanole mit 1 - 3 OH-Gruppen, C1-10 alizyklische 15 Alkohole mit 1 - 3 OH-Gruppen, C1 bis C10 aromatische Alkohole, und Mischungen solcher Stoffe". Bevorzugt ist Ethanol. Das Färbemittel kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus "Kristallviolett, Amidoschwarz, Kresylviolett, und Mischungen solcher 20 Stoffe". Die Matrix kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus "extrahierten natürlichen extrscellulären Matrices verschiedenen Ursprungs, insbesondere aus Rattenschwänzen oder Schweinehaut, deren Hauptbestandteile, insbesondere Collagen, 25 Laminin, Fibronectin, und Mischungen dieser Stoffe". Das Aldehyd kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus "C1 bis C10 Alkanaldehyde, C1 bis C10 alizyklische Aldehyde, aromatische C1 bis C10 Aldehyde, und Mischungen solcher Aldehyde". Bevorzugt 30 sind Formaldehyd und Paraformaldehyd.

Die einzelnen Zellen oder komplexen Gewebe des Präparats können beispielsweise aus Tumorzellen, Nervenzellen, Gliazellen, Muskelzellen, Blutzellen sein bzw. daraus 35 bestehen. Im Bereich der Wirkstoffindung sind die Zellen optimalerweise (aber nicht zwingend) humane Zellen.

Die Erfindung lehrt weiterhin ein Verfahren zur Herstellung

eines morphometrischen Gewebe- oder Zellpräparat wobei die folgenden Verfahrenstufen ausgeführt werden: a) Zellen oder Gewebe werden über eine definierte Zeit unter definierten Bedingungen in einer ausgeprägt dreidimensionalen Matrix kultiviert, b) nach Ablauf der definierten Zeit wird die die kultivierten Zellen oder Gewebe enthaltende Matrix mit einer Fixier- und Färbelösung enthaltend ein Aldehyd sowie ein antigenunspezifisches Färbemittel inkubiert. Bezüglich des erfindungsgemäßen Verfahrens gelten die vorstehenden Anmerkungen zum Präparat analog.

Die Erfindung lehrt weiterhin die Verwendung eines erfindungsgemäßen morphometrischen Gewebe- oder Zellpräparats zur morphometrischen Analyse von kultivierungs- bedingungsbedingten zellulären Prozessen. Mit anderen Worten ausgedrückt, in Stufe a) werden definierte Bedingungen eingestellt, von denen ein bestimmter morphogenetischer Effekt erwartet wird. Dieser wird dann ausgewertet und mit den definierten Bedingungen korreliert, ggf. halbquantitativ oder quantitativ.

Hierunter fällt auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen morphometrischen Gewebe- oder Zellpräparats in einem Verfahren zur Findung von Wirkstoffen, wobei der Wirkstoff in Stufe a) eingesetzt wird, wobei anschließend an Stufe b) eine Aufnahme der Zellen oder des Gewebes mittels beispielsweise eines Lichtmikroskops durchgeführt wird, wobei die erhaltene Aufnahme vorzugsweise mittels eines Bilderkennungssystems ausgewertet wird, wobei das Ergebnis der Auswertung dem Wirkstoff zugeordnet wird und wobei ggf. das Verfahren für verschiedene Wirkstoffe wiederholt wird und die erhaltenen Ergebnisse der Auswertung für verschiedene Wirkstoffe miteinander verglichen werden. Man erhält letztendlich eine quantitative, zumindest jedoch halbquantitative Aussage bezüglich des morphogenetischen Effekts, der von den untersuchten Wirkstoffen hervorgerufen wird. Die Zellen können beispielsweise Ganglienzellen, insbesondere dorsale

-8-

Hinterwurzelganglien, sein, wobei die Auswertung dann z. B. die Erfassung neugebildeter Neuriten umfaßt. Die Zellen können auch Tumorzellen sein, wobei die Auswertung dann z.B. die Erfassung ausgewanderter Zellen umfaßt.

5

Im folgenden wird die Erfindung anhand eines nicht limitierenden Beispiels näher erläutert.

10

Beispiel 1

Es wurde eine Explantatkultur aus dorsalen Hinterwurzelganglien der früh postnatalen Ratte angelegt in einem ausgeprägt dreidimensionalen Collagengel (Maße: Durchmesser 13 mm, Höhe 8 mm). Die Kultivierung erfolgte dann für mehrere Stunden in einem Kulturmedium enthaltend Nervenwachstumsfaktor. Die Kultivierung wurde durch Absaugung des Kulturmediums von dem Gel und durch den folgenden Färbe- und Fixierungsschritt beendet.

20

Beispiel 2

Das in Beispiel 1 erhaltene Gel wurde dann mit einer filtrierten Fixier- und Färbelösung behandelt. Diese enthielt: 2,42 g Kristallviolett, 162 ml Ethanol (100%ig), 323 ml destilliertes Wasser, 16 ml Formaldehyd (35%ig, Rest Wasser), und 0,8 g NaCl. Die Behandlung erfolgte für 5 min. bei 20 °C. Dann wurde mit Wasser gewaschen.

30

Das gewaschene Gel wurde dann auf einem Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert, Hellfeld, Vergrößerung des Objektivs 10x) plaziert und eine Detailaufnahme, wie in Figur 1 gezeigt, angefertigt. In der Figur 1 unten ist der Rand des Explantatkerns erkennbar. Weiterhin erkennt man die daraus aufgrund der Kultivierung mit Nervenwachstumsfaktor ausgewachsenen Neuriten. Es fällt auf, daß eine extrem

35

kontrastreiche Abbildung erhalten wird, die einfach und sicher quantitativ auswertbar ist.

Patentansprüche:

1. Morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat
erhältlich, indem die folgenden Verfahrenstufen
5 ausgeführt werden:
- a) Zellen oder Gewebe werden über eine definierte
Zeit unter definierten Bedingungen in einer
dreidimensionalen Matrix kultiviert,
10
- b) nach Ablauf der definierten Zeit wird die die
kultivierten Zellen oder Gewebe enthaltende
Matrix mit einer Fixier- und Färbelösung ent-
haltend ein Aldehyd sowie ein
15 antigenunspezifisches Färbemittel inkubiert.
2. Morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat nach
Anspruch 1, wobei die Fixier- und Färbelösung
20 Wasser, optional ein mit Wasser mischbares
organisches Lösemittel, und Kochsalz enthält.
3. Morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat nach
25 Anspruch 1 oder 2, wobei die Fixier- und
Färbelösung die folgenden Komponenten enthält:
- A) 0,5 - 35 Gew.-%, vorzugsweise 1 - 2 Gew.-%,
Aldehyd,
30
- B) 0,01 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise 0,3 - 0,6 Gew.-
%, Färbemittel,
- C) 0 - 90 Gew.-%, vorzugsweise 30 - 50 Gew.-%,
35 eines oder mehrerer mit Wasser mischbaren
organischen Lösemittel,
- D) 0 - 90 Gew.-%, vorzugsweise 50 - 70 Gew.-%,

Wasser,

E) 0 - 5 Gew.-%, vorzugsweise 0,1 - 1 Gew.-%,
Kochsalz,

5

wobei die Summe der Anteile der Komponenten A) bis
E) stets 100 Gew.-% ergibt, und

10

wobei das Verhältnis der Gewichtsanteile der
Komponenten E : D in dem Bereich von 1 : 1000 bis 1
: 100 liegt, vorzugsweise dem Verhältnis der Ge-
wichtsanteile einer physiologischen Kochsalzlösung
entspricht.

15

4. Morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat nach
einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Dauer der
Inkubation in Stufe b) im Bereich von 0,5 bis 24 h,
vorzugsweise im Bereich von 1 bis 10 min., beträgt.

20

5. Morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat nach
einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Inkubation
in Stufe b) bei einer Temperatur von 0 °C bis 60
25 °C, vorzugsweise von 0 °C bis 40 °C, durchgeführt
wird.

30

6. Morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat nach
einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das mit Wasser
mischbare organische Lösungsmittel ausgewählt ist
aus der Gruppe bestehend aus "C1-10 Alkanole mit 1
- 3 OH-Gruppen, C1-10 alizyklische Alkohole mit 1
bis 3 OH-Gruppen, C1 bis C10 aromatische Alkohole,
35 und Mischungen solcher Stoffe".

35

7. Morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat nach

einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Färbemittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Kristallviolett, Amidoschwarz, Kresylviolett, und Mischungen solcher Stoffe".

5

8. Morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Matrix ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "natürliche extracelluläre Matrices verschiedenen Ursprungs, insbesondere aus Rattenschwanz oder Schweinehaut, Hauptbestandteile solcher Matrices, insbesondere Collagen, Laminin, Fibronectin, und Mischungen dieser Stoffe".

15

9. Morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Aldehyd ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "C1 bis C10 Alkanaldehyde, C1 bis C10 alizyklische Aldehyde, aromatische C1 bis C10 Aldehyde, und Mischungen solcher Aldehyde"

20

10. Morphometrisches Gewebe- oder Zellpräparat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Zellen oder das Gewebe ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus "Tumorzellen, Nervenzellen, Gliazellen, Muskelzellen, Blutzellen, Gewebe enthaltend solche Zellen, und Mischungen solcher Zellen", vorzugsweise humanen Ursprungs sind.

30

11. Verfahren zur Herstellung eines morphometrischen Gewebe- und/oder Zellpräparats wobei die folgenden Verfahrenstufen ausgeführt werden:

35

a) Zellen oder Gewebe werden über eine definierte

Zeit unter definierten Bedingungen in einer ausgeprägt dreidimensionalen Matrix kultiviert,

- 5 b) nach Ablauf der definierten Zeit wird die die kultivierten Zellen oder Gewebe enthaltende Matrix mit einer Fixier- und Färbelösung enthaltend ein Aldehyd sowie ein antigenunspezifisches Färbemittel inkubiert.
- 10
12. Verwendung eines morphometrischen Gewebe- und/oder Zellpräparats nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur morphometrischen Analyse von kultivierungsbedingungsbedingten zellulären Prozessen.
- 15
13. Verwendung eines morphometrischen Gewebe- und/oder Zellpräparats nach einem der Ansprüche 1 bis 10 in einem Verfahren zur Findung von Wirkstoffen, wobei der Wirkstoff in Stufe a) eingesetzt wird, wobei
- 20 anschließend an Stufe b) eine Aufnahme der Zellen oder des Gewebes mittels eines Lichtmikroskops durchgeführt wird, wobei die erhaltene Aufnahme vorzugsweise mittels eines Bilderkennungssystems ausgewertet wird, wobei das Ergebnis der Auswertung dem Wirkstoff zugeordnet wird
- 25 und wobei ggf. das Verfahren für verschiedene Wirkstoffe wiederholt wird und die erhaltenen Ergebnisse der Auswertung für verschiedene Wirkstoffe miteinander verglichen werden.
- 30
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Zellen Neurone, insbesondere aus dorsalen Hinterwurzelganglien, sind und wobei die Auswertung die Erfassung neugebildeter
- 35 Neuriten umfaßt.
15. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Zellen

Tumorzellen sind und wobei die Auswertung die Erfassung ausgewanderter Zellen umfaßt.

- 5 16. Fixier- und Färbelösung zur Herstellung von
morphometrischen Zell- und/oder Gewebepräparaten,
welche die folgenden Komponenten enthält:
- 10 A) 0,5 - 35 Gew.-%, vorzugsweise 1 - 2 Gew.-%,
Aldehyd,
- B) 0,01 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise 0,3 - 0,6 Gew.-
%, Färbemittel,
- 15 C) 0 - 90 Gew.-%, vorzugsweise 30 - 50 Gew.-%,
eines oder mehrerer mit Wasser mischbaren
organischen Lösemittel,
- 20 D) 0 - 90 Gew.-%, vorzugsweise 50 - 70 Gew.-%,
Wasser,
- E) 0 - 5 Gew.-%, vorzugsweise 0,1 - 1 Gew.-%,
Kochsalz,
- 25 wobei die Summe der Anteile der Komponenten A) bis
E) stets 100 Gew.-% ergibt, und wobei das
Verhältnis der Gewichtsanteile der Komponenten E :
D in dem Bereich von 1 : 1000 bis 1 : 100 liegt,
vorzugsweise dem Verhältnis der Gewichtsanteile
30 einer physiologischen Kochsalzlösung entspricht.

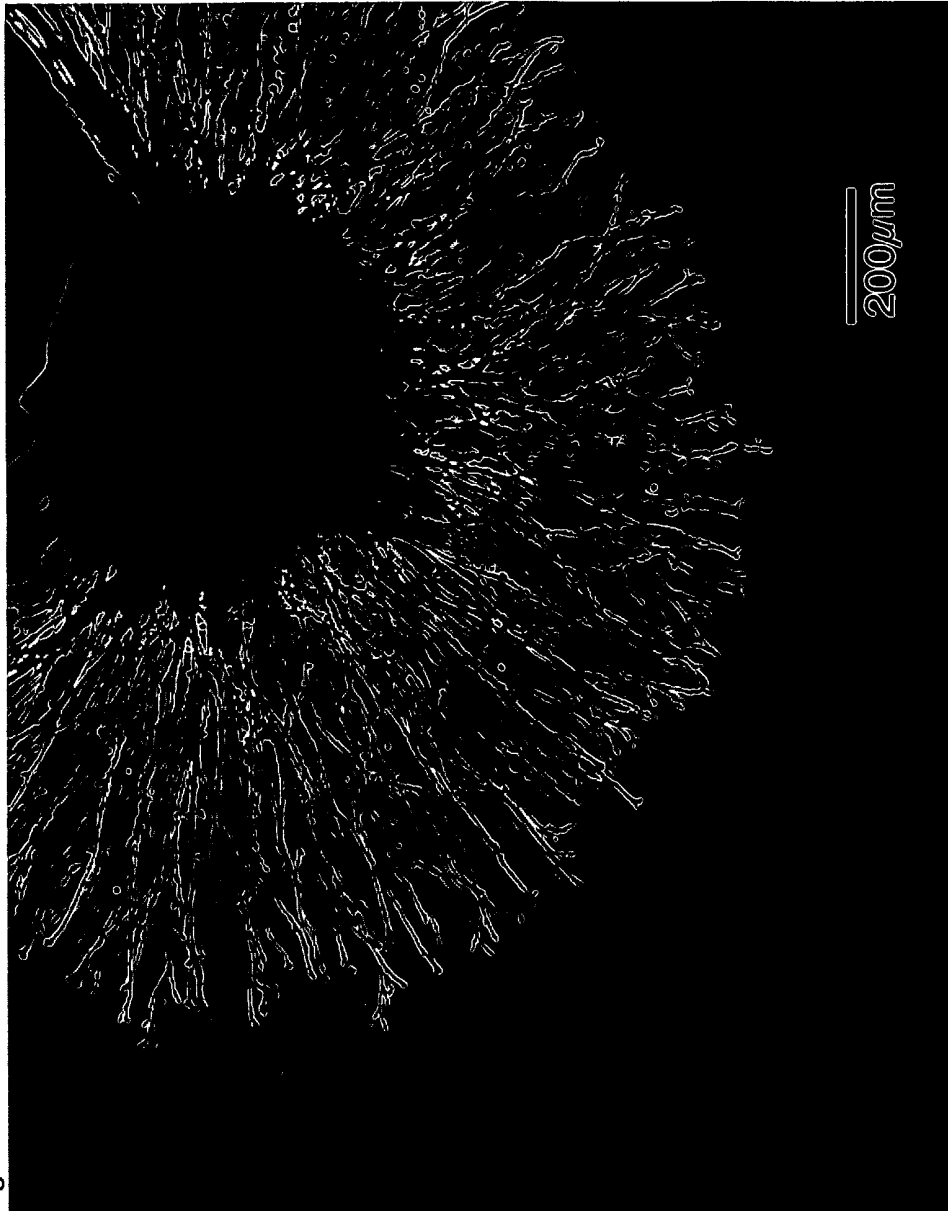


Fig. 1