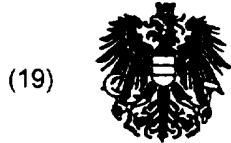


AT 406 310 B



**REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt**

(19)

(11) Nummer: **AT 406 310 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1584/98 (51) Int. Cl.⁷: **G01N 33/483**
(22) Anmelddatum: 22.09.1998 G01N 33/49, C12Q 1/00
(42) Beginn der Patentdauer: 15.08.1999
(45) Ausgabetag: 25.04.2000

(30) Priorität:

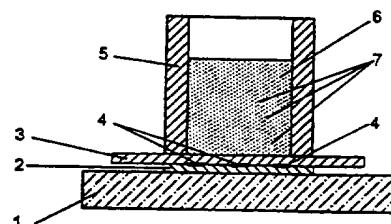
(73) Patentinhaber:
EGGER GERD DR.
A-8010 GRAZ, STEIERMARK (AT).

(56) Entgegenhaltungen:
AT 394455B DE 3119269A1

(72) Erfinder:
EGGER GERD DR.
GRAZ, STEIERMARK (AT).

(54) **VORRICHTUNG ZUR MESSUNG DER MIGRATIONSFÄHIGKEIT VON AMÖBOID BEWEGLICHEN ZELLEN**

(57) Vorrichtung zur Messung der Migrationsfähigkeit von amöboid beweglichen Zellen bestehend aus einem plattenförmigen Wirkstoffdepot (2), einem darüber befindlichen Membranfilter (3) und mindestens einem darauf angeordneten, mit einer bodenseitigen Öffnung versehenen Behälter (5) für eine amöboid bewegliche Zellen (7) enthaltende Flüssigkeit (6), wobei die bodenseitige Öffnung des Behälters (5) an das Membranfilter (3) anliegt. Dabei ist die Fläche des Membranfilters (3) mindestens 1.6-mal so groß wie die Fläche der Bodenöffnung des Behälters (5).



Die gegenständliche Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Messung der Migrationsfähigkeit von amöboid beweglichen Zellen bestehend aus einem plattenförmigen Wirkstoffdepot, einem darüber befindlichen Membranfilter und mindestens einem darauf angeordneten, mit einer bodenseitigen Öffnung versehenen Behälter, wobei die bodenseitige Öffnung des Behälters an das Membranfilter anliegt. Als Wirkstoffe werden alle Substanzen verstanden, welche auf die Migration von amöboid beweglichen Zellen eine fördernde oder hemmende Wirkung ausüben.

Da die Migrationsfähigkeit von amöboid beweglichen Zellen ein wesentliches Charakteristikum derartiger Zellen darstellt, ist sie für die theoretische und angewandte Medizin von großem Interesse. Hinsichtlich der Bedeutung der Messung der Migrationsfähigkeit von amöboid beweglichen Zellen, deren Anwendung in der Humanmedizin und betreffend eine Vorrichtung gemäß dem Stand der Technik wird auf die Ausführungen in der AT 394 455 B verwiesen.

Der gegenständlichen Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, diese aus dem Stand der Technik bekannte Vorrichtung zur Messung der Migrationsfähigkeit von amöboid beweglichen Zellen dahingehend zu verbessern, daß einerseits die Wirksamkeit dieser Vorrichtung und deren Meßgenauigkeit erhöht werden und daß andererseits das Meßverfahren erheblich vereinfacht sowie dessen Durchführung wesentlich beschleunigt werden, wodurch die Durchführung von Meßserien erleichtert wird.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Fläche des Membranfilters mindestens 1.6-mal so groß wie die Fläche der Bodenöffnung des Behälters ist.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform ist das Wirkstoffdepot mit dem Membranfilter durch Klebung verbunden, wobei einzelne Klebestellen punktförmig, z.B. in einem gitterförmigen Raster, über die zu verklebenden Flächen verteilt sind, wobei die gesamte Klebefläche maximal 30% der aneinander liegenden Flächen des Wirkstoffdepots und des Membranfilters beträgt. Mit einer derartigen Anordnung wird ein enger Kontakt zwischen dem Wirkstoffdepot und dem Membranfilter bei gleichzeitiger Durchgängigkeit für Flüssigkeiten und in diesen gelösten Substanzen zwischen dem Wirkstoffdepot und dem Membranfilter gewährleistet.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind das Wirkstoffdepot, das Membranfilter und der Behälter auf eine Trägerplatte aus einem durchsichtigen bzw. durchscheinenden Material aufgesetzt und sind das Wirkstoffdepot sowie das Membranfilter aus einem transparenten Material oder einem Material, welches in einen transparenten Zustand veränderbar ist, hergestellt. Hierdurch ist die Auswertung der Migrationsfähigkeit der Zellen in einem mikroskopischen Durchlichtverfahren möglich.

Um weiters Meßserien mit großem Umfang zu erleichtern, können einzelnen Meßanordnungen, welche z.B. unterschiedliche Wirkstoffe enthalten, zu einer Meßeinheit zusammengefaßt sein, wobei die Meßanordnungen zur Erhöhung der Genauigkeit mehrfach vorgesehen sein können. Hierfür ist vorzugsweise das Membranfilter als zumindest angenähert rechteckige Platte ausgebildet, an deren Unterseite mehrere Wirkstoffdepots, insbesondere durch Klebung, befestigt sind und auf welchen mehrere Behälter für die zu untersuchenden Zellen angeordnet sind, wobei jedem Behälter ein eigenes Wirkstoffdepot zugeordnet ist. Dabei können die Behälter in nebeneinander befindlichen Reihen angeordnet sein, wobei die Behälter einer Reihe miteinander durch Stege od. dgl. zu Einheiten verbunden sind.

Zudem können die Behälter mit dem Membranfilter gleichfalls durch Klebung verbunden sein. Diese Klebung ist vorzugsweise so ausgebildet, daß sie sich nach Beendigung des Migrationsvorganges vom Membranfilter leicht und ohne Beschädigung desselben lösen läßt. Vorzugsweise sind auch dabei die Wirkstoffdepots, das Membranfilter und die darüber befindlichen Behälter auf eine sich längserstreckende Trägerplatte aus einem durchsichtigen bzw. durchscheinenden Material aufgesetzt und sind die Wirkstoffdepots und das Membranfilter aus einem transparenten Material oder aus einem in einen transparenten Zustand veränderbaren Material hergestellt.

Erfindungsgemäße Vorrichtungen sind nachstehend anhand von in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine erste Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, in vertikalem Schnitt, und die Fig. 2 und 2a eine zweite Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, welche eine Meßeinheit darstellt und welche die Durchführung von Meßserien mit großem Umfang erleichtert, in vertikalem Schnitt nach der Linie A-A der Fig. 2 a und in Draufsicht.

In Fig. 1 ist eine Trägerplatte 1 dargestellt, auf welcher sich ein Wirkstoffdepot 2 befindet. Oberhalb des Wirkstoffdepots 2 befindet sich ein Membranfilter 3, welches mit dem Wirkstoffdepot

2 mittels mehrerer Klebungen 4 verbunden ist. Oberhalb des Membranfilters 3 befindet sich ein rohrförmiger Behälter 5, in welchen eine Flüssigkeit 6 eingebracht ist, welche Zellen 7 enthält, deren Migrationsfähigkeit gemessen werden soll. Dabei weist das Membranfilter 3 eine Fläche auf, welche zumindest der 1.6-fachen Größe der Bodenöffnung des Behälters 5 gleich ist.

5 Durch das Membranfilter 3 wird auf die Flüssigkeit 6 mit den in dieser enthaltenen Zellen 7 eine Saugwirkung ausgeübt. Hierdurch gelangt Flüssigkeit auch in das unterhalb des Membranfilters 3 angeordnete Wirkstoffdepot 2, wobei Anteile des Wirkstoffs gelöst werden, welche in weiterer Folge in das Membranfilter 3 und in die darüber befindliche Flüssigkeit diffundieren. Hierdurch wird auf die Zellen 7 in einer solchen Weise eingewirkt, daß ihre Einwanderung in das Membranfilter 3 beeinflußt wird.

10 Dadurch daß die Fläche des Membranfilters 3 mindestens 1.6-mal so groß wie die Bodenöffnung des Behälters 5 ist, wird auf die im Behälter 5 befindliche Flüssigkeit 6 mit den in dieser enthaltenen Zellen 7 eine wesentlich stärkere Saugwirkung ausgeübt, als dies dann der Fall ist, wenn das Membranfilter der Größe der Bodenöffnung des Behälters 5 annähernd gleich ist. Die Zellen 7 werden dadurch mit dem Membranfilter 3 rascher in Kontakt gebracht und können schneller in dieses eindringen, wodurch die Meßdauer verkürzt wird.

15 Da sich die Migrationsfähigkeit mancher Zelltypen außerhalb des Organismus schnell verändern kann, wird durch eine verkürzte Meßdauer die diagnostisch bedeutsame ursprüngliche Migrationsbereitschaft der Zellen besser erfaßt. Durch die verstärkte Saugfähigkeit des vergrößerten Membranfilters werden somit gegenüber dem bekannten Stand der Technik wesentlich genauere Meßergebnisse erzielt.

20 Dadurch, daß das Wirkstoffdepot 2 mit dem Membranfilter 3 durch Klebung dicht anliegend verbunden ist, erfolgt die Lösung des Wirkstoffs und dessen Diffusion in das Membranfilter 3 und weiter in die im Behälter 5 befindliche Flüssigkeit 6 in kontrollierter und in gleichmäßiger Weise, was eine der Voraussetzungen für die Reproduzierbarkeit und Normierbarkeit von Migrationsmessungen darstellt. Dabei darf jedoch die Gesamtheit der Klebeflächen 4 nicht mehr als 30% der aneinander-liegenden Flächen überdecken, da andernfalls die Diffusion der Flüssigkeit in das Wirkstoffdepot 2 und zudem auch die Diffusion des gelösten Wirkstoffs aus dem Wirkstoffdepot 2 in das Membranfilter 3 stark eingeschränkt werden würden. Die einzelnen Klebeflächen 4 können dabei in einem gitterförmigen Raster angeordnet sein.

25 Nach Beendigung des Migrationsvorganges werden die in das Membranfilter 3 eingewanderten Zellen, z.B. durch Färben, erkennbar gemacht, worauf ihre Zahl, Verteilung und Form mittels eines mikroskopischen Auswertungsverfahrens bestimmt wird. Sofern die Bestandteile der Vorrichtung transparent sind oder transparent gemacht werden können, kann hierfür ein Durchlichtverfahren angewendet werden.

30 Anhand der Fig. 1 sind der grundsätzliche Aufbau und die grundsätzliche Funktion einer derartigen Vorrichtung erläutert. Demgegenüber ist in den Fig. 2 und 2a eine solche Vorrichtung dargestellt, mittels welcher die erleichterte Durchführung von Meßserien erfolgen kann. In dieser Vorrichtung sind mehrere der in Fig. 1 dargestellten Bauteile zu einer Meßeinheit zusammengefaßt, wodurch eine einfache, rasche und leicht überschaubare Migrationsmessung ermöglicht wird.

35 Diese Vorrichtung besteht aus einer rechteckigen Trägerplatte 11, welche vorzugsweise aus einem durchsichtigen oder durchscheinenden Material hergestellt ist. Auf dieser Trägerplatte 11 befindet sich ein mattenartiges Membranfilter 13, welches mehrere voneinander im Abstand befindliche Wirkstoffdepots 12 überdeckt. Dabei sind die Wirkstoffdepots 12 mit dem Membranfilter 13 mittels mehrerer Klebungen 14 verbunden. Die Wirkstoffdepots 12 sowie diejenigen Anteile des Membranfilters 13, welche die Wirkstoffdepots 12 nicht bedecken, sind mit der Trägerplatte 11 gleichfalls durch Klebungen verbunden.

40 In diesem Ausführungsbeispiel befinden sich oberhalb des Membranfilters 13 zwei Reihen von jeweils drei Behältern 15 und 15a, in welche die Flüssigkeit 16 mit den zu untersuchenden Zellen 17 eingebracht ist. Die einzelnen Behälter 15 und 15a der beiden Reihen sind mittels Stegen 18 und 18a miteinander zu Einheiten verbunden. Hierdurch können sie bei der Herstellung der Vorrichtung gemeinsam auf das Membranfilter 13 aufgesetzt und mit diesem verklebt werden. Zudem können sie nach dem Migrationsvorgang und der Präparation der in das Membranfilter 13 eingewanderten Zellen gemeinsam vom Membranfilter 13 abgelöst werden. Die sich unter den drei Behältern 15 befindlichen Wirkstoffdepots 12 sind mit einem Wirkstoff beladen, wogegen sich die unter den dazu parallel angeordneten Behältern 15a befindlichen Wirkstoffdepots deshalb keinen Wirkstoff enthalten, da sie der Messung der unstimulierten, spontanen Zellmigration dienen. Die im

Anwendungsbeispiel gleichzeitig durchgeführte, dreifache Messung dient der Erhöhung der Meßgenauigkeit.

Gemäß einem anderen Ausführungsbeispiel sind die Wirkstoffdepots 12 unter den Behältern 15 bzw. 15a jeweils mit unterschiedlichen Wirkstoffen beladen, wodurch deren unterschiedliche 5 Wirkungen auf die Migration der zu untersuchenden Zellen verglichen werden kann.

Gemäß einem weiteren Verfahren werden nach dem Abschluß des Migrationsvorganges durch Einfüllen von dazu geeigneten Substanzen in die Behälter 15 und 15a die in das Membranfilter 13 eingewanderten Zellen fixiert und gefärbt. Nach Abschluß der Präparation werden die Behälter 15 und 15a vom Membranfilter 13 abgelöst. Hierauf sind die in das Membranfilter 13 eingewanderten 10 Zellen einer mikroskopischen Untersuchung zugänglich.

In einem Ausführungsbeispiel weisen die Behälter 15 und 15a einen Innendurchmesser von etwa 7 mm und eine Höhe von etwa 9 mm auf. Das Membranfilter 13 und die Wirkstoffdepots 12 weisen jeweils eine Dicke von 140 µm auf. Die Behälter 15 und 15a sowie die Trägerplatte 11 können aus Kunststoff oder aus Glas hergestellt sein. Maßgeblich ist dabei, daß sie gegenüber den 15 zum Einsatz gebrachten Medien und den zu untersuchenden Zellen indifferent sind.

Patentansprüche:

1. Vorrichtung zur Messung der Migrationsfähigkeit von amöboid beweglichen Zellen bestehend aus einem plattenförmigen Wirkstoffdepot (2;12), einem darüber befindlichen Membranfilter (3; 13) und mindestens einem darauf angeordneten, mit einer bodenseitigen Öffnung versehenen Behälter (5; 15) für eine amöboid bewegliche Zellen (7; 17) enthaltende Flüssigkeit (6; 16), wobei die bodenseitige Öffnung des Behälters (5; 15) an das Membranfilter (3; 13) anliegt, dadurch gekennzeichnet, daß die Fläche des Membranfilters (3; 13) mindestens 1.6-mal so groß wie die Fläche der Bodenöffnung des Behälters (5; 15) ist (Fig. 1, Fig. 2).
2. Vorrichtung nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das mindestens eine Wirkstoffdepot (2) mit dem Membranfilter (3) durch Klebung (4) verbunden ist, wobei die Gesamtheit der Klebeflächen (4) maximal 30% der aneinanderliegenden Flächen des Wirkstoffdepots (2) und des Membranfilters (3) beträgt (Fig. 1).
3. Vorrichtung nach einem der Patentansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Fläche des Wirkstoffdepots (2) in an sich bekannter Weise der Bodenfläche des Behälters (5) angenähert gleich ist (Fig. 1).
4. Vorrichtung nach einem der Patentansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Wirkstoffdepot (2), das Membranfilter (3) und der Behälter (5) auf einer Trägerplatte (1) aus einem durchsichtigen bzw. durchscheinenden Material aufgesetzt sind und daß das Wirkstoffdepot (2) und das Membranfilter (3) aus einem transparenten Material oder einem Material, welches in einen transparenten Zustand veränderbar ist, hergestellt sind (Fig. 1).
5. Vorrichtung nach einem der Patentansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranfilter (13) als eine zumindest angenähert rechteckige Platte ausgeführt ist, an deren Unterseite mehrere Wirkstoffdepots (12) befestigt, insbesondere angeklebt, sind und auf welchem mehrere Behälter (15,15a) angeordnet sind, wobei Gruppen von Behältern (15, 15a) miteinander durch Stege (18, 18a) oder dgl. zu Einheiten verbunden sind (Fig.2, 2a).
6. Vorrichtung nach Patentanspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Behälter (15, 15a) in nebeneinander befindlichen Reihen angeordnet sind, wobei die Behälter (15, 15a) jeweils einer Reihe miteinander zu Einheiten verbunden sind.
7. Vorrichtung nach einem der Patentansprüche 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Behälter (15, 15a) mit dem Membranfilter (13) durch Klebung verbunden sind.
8. Vorrichtung nach einem der Patentansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirkstoffdepots (12), das Membranfilter (13) und die darauf befindlichen Behälter (15, 15a) auf eine sich längserstreckende Trägerplatte (11) aus einem durchsichtigen bzw. durchscheinenden Material aufgesetzt sind und daß die Wirkstoffdepots (12) und das Membranfilter (13) aus einem transparenten Material oder aus einem in einen transparenten Zustand veränderbaren Material hergestellt sind.

A T 4 0 6 3 1 0 B

Hiezu 1 Blatt Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

FIG.1

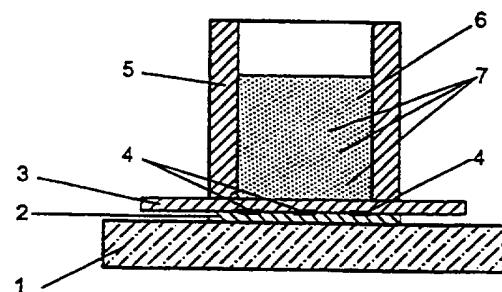


FIG.2

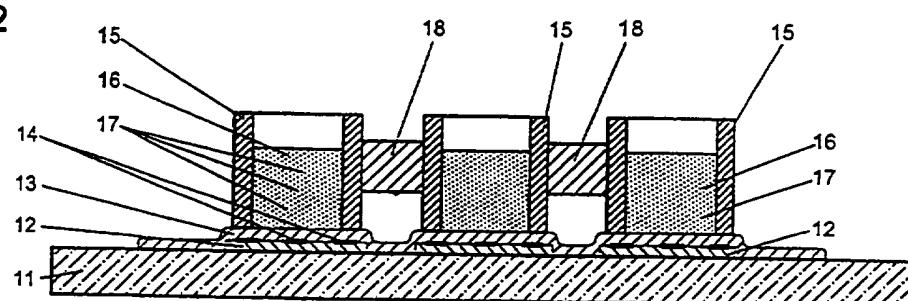


FIG.2a

