

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 27/90

(51) Int.Cl.⁵ : **C12Q 1/06**

(22) Anmeldetag: 8. 1.1990

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 5.1993

(45) Ausgabetag: 27.12.1993

(56) Entgegenhaltungen:

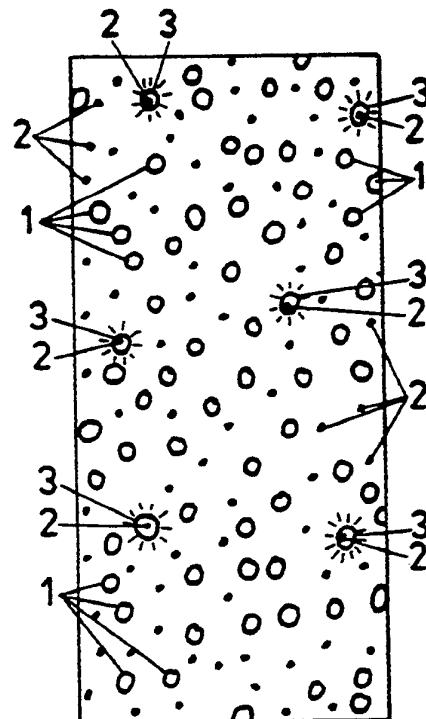
WO-A1-86/05206
US-A- 4242447 DE-A1-3117241

(73) Patentinhaber:

KOHLWEG ERNST DR.
A-9330 TREIBACH/ALTHOFEN, KÄRNTEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON PHAGOZYTÖSEAKTIVEN ZELLEN

(57) Zur Bestimmung von phagozytoseaktiven Zellen, insbesondere Makrophagen, in einer Zellkultur auf fluoreszenzoptischem Weg, wird die Zellkultur mit einer Suspension von Teilchen eines nicht fluoreszierenden Derivates eines Fluoreszenzfarbstoffes in einem wässrigen Medium in Kontakt gebracht, worauf die phagozytoseaktiven Zellen nach intrazellulärer Aufnahme der Teilchen und nach dessen enzymatischer Spaltung zum Fluoreszenzfarbstoff fluoreszenzoptisch sichtbar gemacht und quantitativ erfaßt werden.



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von phagozytoseaktiven Zellen, insbesondere Makrophagen, in einer Zellkultur auf fluoreszenzoptischem Weg.

Phagozytierende Zellsysteme erfüllen eine wichtige Funktion bei der Abwehr körperfremder Mikroorganismen und anderer korpuskulärer Strukturen, indem sie diese in das Zellinnere aufnehmen (= phagozytieren) und enzymatisch abbauen. Diese Zellsysteme verleihen dem Organismus die sogenannte unspezifische zelluläre Immunität. Phagozytoseaktiv sind vor allem die segmentkernigen Granulozyten des Blutes, sowie die über zahlreiche Organe (insbesondere Leber, Milz, Lymphknoten, Lunge, Niere) verteilten Makrophagen.

Erst nach intrazellulärem Abbau des Phagozytosesubstrates entstehen jene geeigneten Fragmente, welche unter gleichzeitiger Abgabe zahlreicher Botenstoffe (u. a. Interleukine, Interferone) anderen immunkompetenten Zellen (insbesondere T-Lymphozyten) weitergegeben werden und eine umfassende immunologische Abwehrreaktion einleiten.

Aufgrund dieser zentralen Stellung im Immunsystem kommt einer Messung der funktionellen Leistung dieses Zellsystems bei der Beurteilung des Immunstatus eines Patienten große Bedeutung zu.

Es ist bekannt, Makrophagen durch Anfärben mit bestimmten Farbstoffen sichtbar zu machen, sodaß sie in einer gegebenen Probe oder Kultur ausgezählt werden können. Diese Auszählung ergibt aber nur die Gesamtzahl der vorhandenen Makrophagen und läßt keinen Rückschluß auf ihren Funktionszustand zu.

Dieser Funktionszustand wird heute üblicherweise so bestimmt, daß den Zellen ein Phagozytosesubstrat angeboten wird, wobei eine eventuelle Aufnahme des Substrates in das Zellinnere lichtmikroskopisch verfolgt wird. Diese Methode liefert aber nur ungenaue Ergebnisse, die noch dazu schlecht reproduzierbar sind. Aussagekräftiger wird die Bestimmung, wenn eine radioaktive Substanz an das Phagozytosesubstrat gekoppelt wird. Diese Methode erfordert aber andererseits einen erheblichen apparativen Aufwand.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, ein Bestimmungsverfahren auf fluoreszenzoptischer Basis zur Verfügung zu stellen, mit welchem der Anteil an phagozytoseaktiven Zellen in einer Zellkultur genau und auf einfache Weise bestimmt werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß so gelöst, daß die Zellkultur mit einer Suspension von Teilchen eines nicht fluoreszierenden Derivates eines Fluoreszenzfarbstoffes in einem wässrigen Medium in Kontakt gebracht wird, worauf die phagozytoseaktiven Zellen nach intrazellulärer Aufnahme der Teilchen und nach enzymatischer Spaltung des Derivates zum Fluoreszenzfarbstoff fluoreszenzoptisch sichtbar gemacht und quantitativ erfaßt werden.

Zwar ist das Phänomen der intrazellulären Freisetzung eines Fluoreszenzfarbstoffes bekannt und wird zur Schnellfärbung von Bakterien und Zellen verwendet. Neu hingegen, und darin besteht die Erfindung, ist die Tatsache, daß Fluoreszeindilaurat in Partikelform selektiv von phagozytierenden Zellen des Immunsystems (insbesondere Makrophagen) aufgenommen wird. In der Folge kommt es zu einer homogenen Verteilung dieses Farbstoffes innerhalb der Zelle. Wird nun die Zellkultur mit Licht geeigneter Wellenlänge bestrahlt, so kommt es durch die Fluoreszenz des Farbstoffes im Zellinneren zu einem intensiven Leuchten dieser Zelle, die nun auf einfache Weise im Mikroskop als phagozytoseaktiv erkannt werden kann.

Als Phagozytosesubstrat eignet sich jedes Derivat von bekannten Fluoreszenzfarbstoffen, sofern es selbst nicht fluoresziert und aufgrund der bei der Phagozytose ablaufenden chemischen Prozesse in den Fluoreszenzfarbstoff übergeführt wird.

Die Bestimmung wird so durchgeführt, daß die Zellkultur zunächst mit der Suspension des nicht fluoreszierenden Derivates inkubiert wird. Im Hellfeld des Mikroskopes wird dann die Gesamtzahl der Zellen durch Auszählen ermittelt. Anschließend erfolgt nach Umstellung auf die Fluoreszenzoptik bei gleichem Blickfeld die Auszählung der fluoreszierenden Zellen und so die Bestimmung des prozentuellen Anteiles der phagozytoseaktiven Zellen an der Gesamtzahl.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, daß ein nicht fluoreszierendes Derivat von Fluorescein eingesetzt wird, wobei sich als nicht fluoreszierende Derivate von Fluorescein seine Di-Fettsäureester, insbesondere das Di-Laurat, am besten bewährt haben.

Die Teilchen sollten einen Durchmesser von maximal 20 µm, vorzugsweise kleiner als 5 µm, haben, um leicht phagozytiert werden zu können.

Die Zellkultur wird mit der Teilchensuspension bevorzugt dadurch in Kontakt gebracht, indem die Zellkultur mit der Teilchensuspension gemischt und die Mischung 24 Stunden bei 37 °C inkubiert wird.

Es hat sich gezeigt, daß beim erfindungsgemäßen Verfahren nur jene Zellen leuchten, welche das Teilchen vollständig in das Zellinnere aufgenommen haben. Die außerhalb der Zellen lokalisierten Teilchen zeigen keinerlei Fluoreszenz; auch nicht die an die Zellwände angelagerten. Das erfindungsgemäße Bestimmungsverfahren ermöglicht somit eine empfindliche und selektive Erfassung phagozytoseaktiver Zellen.

In der Zeichnung ist der Zustand der Zellkultur nach Inkubation mit der Teilchensuspension, wie er sich unter dem Mikroskop darstellt, schematisch wiedergegeben, wobei mit (1) die nicht phagozytoseaktiven Zellen bezeichnet sind, mit (2) die Teilchen des nicht fluoreszierenden Derivates des Fluoreszenzfarbstoffes und mit (3) jene Zellen, welche diese Teilchen phagozytiert enthalten. Diese phagozytoseaktiven Zellen leuchten bei Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge, also bei fluoreszenzoptischer Umstellung des Mikroskopes. Das Leuchten ist in der Zeichnung durch radiale Striche an den Zellen (3) angedeutet.

Mit den nachfolgenden Beispielen wird das erfindungsgemäße Verfahren noch näher erläutert.

Beispiel 1

Durch zweimalige Instillation von jeweils 5 ml MEM (minimum essential medium) mit Hanks-Salzen unter Zusatz von L-Glutamin (200 mmol/l), Refobacin (100 µg/ml) und Penicillin G (100 E/ml) in die Peritonealhöhle einer ca. 20 Wochen alten, femininen Swiss-Maus und anschließender Wiedergewinnung des Lavates wurde eine Zellsuspension von ca. $0,5 \times 10^6$ /ml gewonnen. Diese Zellsuspension enthielt überwiegend Peritonealmakrophagen, daneben noch Lymphozyten und Fibroblasten.

Jeweils 3 ml davon wurden in je eine sterile Petrischale eingebracht. Danach wurden 200 mg Fluorescein-Dilaurat (Fa. Sigma) in 10 ml PBS (buffered base saline) derart suspendiert, daß ein genügend hoher Anteil an Partikeln mit einem Durchmesser von unter 5 µm gegeben war. Von dieser Suspension wurden jeweils 0,1 ml den beiden Kulturen zugesetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C und Begasung mit 4 %igem CO₂ wurde der Überstand dekantiert und die mittlerweile auf dem Boden der Petrischalen haftenden und sich ausbreitenden Makrophagen der licht- und der fluoreszenzoptischen Untersuchung zugeführt.

Unter 320 lichtmikroskopisch ausgezählten Zellen fand sich ein fluoreszierender Anteil von 8 %.

Beispiel 2

Um die prinzipielle Übertragbarkeit der an der Maus-Makrophagenkultur gewonnenen Erkenntnisse auf phagozytierende Zellen des menschlichen Blutes (segmentkernige Granulozyten) nachzuweisen, wurden von einem freiwilligen Spender durch Armvenenpunktion 2 ml Vollblut in einem heparinisierten Röhrchen gewonnen und mit 4 ml des oben beschriebenen Kulturmediums verdünnt und nach Zusatz von 0,2 ml der Fluorescein-Dilaurat-Suspension 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die anschließende fluoreszenzoptische Durchsuchung der Vollblutkultur konnte ebenfalls fluoreszierende Zellen zur Einstellung bringen, welche bei lichtmikroskopischer Umstellung als segmentkernige Granulozyten zu identifizieren waren.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bestimmung von phagozytoseaktiven Zellen, insbesondere Makrophagen, in einer Zellkultur auf fluoreszenzoptischem Weg, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellkultur mit einer Suspension von Teilchen von Fluoreszeindilaurat in einem wässrigen Medium in Kontakt gebracht wird, worauf die phagozytoseaktiven Zellen nach intrazellulärer Aufnahme der Teilchen und nach enzymatischer Spaltung des Fluoreszeindilaurates fluoreszenzoptisch sichtbar gemacht und quantitativ erfaßt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchen einen Durchmesser von maximal 20 µm, vorzugsweise kleiner als 5 µm, aufweisen.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellkultur mit der Teilchensuspension in Kontakt gebracht wird, indem die Zellkultur mit der Teilchensuspension gemischt und die Mischung 24 Stunden bei 37 °C inkubiert wird.

Hiezu 1 Blatt Zeichnung

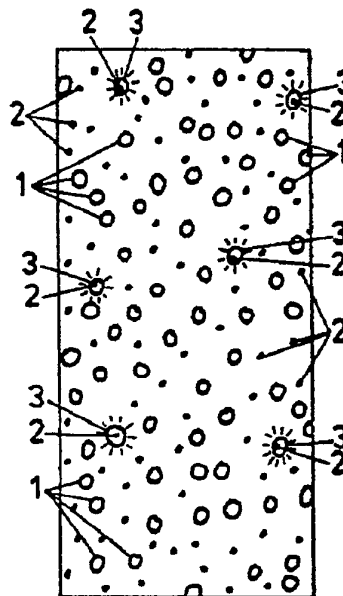


FIG. 1