

(12)

# PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2183/90

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> : **G01N 33/483**  
G01N 33/49

(22) Anmeldetag: 30.10.1990

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 9.1991

(45) Ausgabetag: 10. 4.1992

(56) Entgegenhaltungen:

DE-A1-3119269

(73) Patentinhaber:

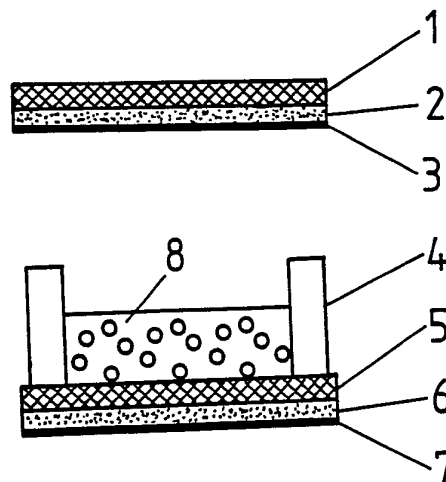
EGGER GERD DR.  
A-8010 GRAZ, STEIERMARK (AT).

(72) Erfinder:

EGGER GERD DR.  
GRAZ, STEIERMARK (AT).

## (54) EIN MEMBRANFILTERSYSTEM ZUR MESSUNG DER ZELLMIGRATION

(57) Vorrichtung und Verfahren zur Messung der Migration amöboid beweglicher Zellen, insbesondere weißer Blutzellen, mittels eines Membranfiltersystems. Das System besteht aus einem Membranfilter (1), an dem einseitig eine Trägermatrix (2) für Testsubstanzen angebracht ist, die wiederum an der dem Membranfilter gegenüberliegenden Seite von einer undurchlässigen Grenzschicht (3) abgeschlossen wird. Die festen Testsubstanzen lösen sich in dem wäßrigen Milieu, in dem die zu untersuchenden Zellen von der Membranfilterseite an das System herangebracht werden, wobei das Lösungsverhalten durch Liberationsstabilisatoren beeinflusst werden kann. Die undurchlässige Grenzschicht (3) zwingt die gelösten Testsubstanzen, in Richtung des Membranfilters zu diffundieren, um hier die Migration der einwandernden Zellen zu beeinflussen. Die Beurteilung der Migrationsleistung geschieht anhand der Zahl und Verteilung der Zellen im Membranfilter (1), die mikroskopisch bestimmt werden. Das Membranfiltersystem kann zur Migrationsmessung in vivo und in vitro eingesetzt werden. Zur Migrationsmessung in vitro wird ein Behälterring (4) an der Membranfilterseite des Systems (5,6,7) befestigt. In den Behälter (4) wird eine Suspension der zu testenden Zellen (8) eingefüllt.





Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Messung der aktiven Fortbewegung amöboid beweglicher Zellen (Migration) mittels Membranfilter. Diese Zellen erreichen durch ihre Fähigkeit zur Migration Zielorte, an denen sie weitere Aktivitäten entfalten. Die Migration ist eine wesentliche Funktion dieser Zellen und daher für die theoretische und angewandte Wissenschaft von Interesse. Es ist die Zielsetzung der Erfindung, eine Methode zur Verfügung zu stellen, mit der die Migrationsleistung von Zellen einfach, zeitsparend und genau gemessen werden kann.

Grundsätzlich kann mit der Erfindung die Migrationsleistung jeder zur amöboiden Fortbewegung fähigen Zelle getestet werden, wie z. B. von pflanzlichen oder tierischen Zellen oder von Tumorzellen.

Ein Einsatzgebiet, dem große praktische Bedeutung in der Humanmedizin zukommt, ist die Messung der Migration weißer Blutzellen (Leukocyten), wie z. B. von Neutrophilen Granulocyten oder von Monocyten. Die Erfindung ist vorzüglich dazu geeignet, auf die besondere und eigenständige Problematik dieses Einsatzgebietes einzugehen. Leukocyten sind die Hauptträger des akuten Entzündungsvorganges und nehmen in der Infektabwehr wesentliche Funktionen ein. Sie sind durch die Migration unter anderem befähigt, sich in den Geweben des Körpers zu bewegen und eingedrungene Mikroorganismen aufzufinden, um sie in weiterer Folge abzubauen und auf diese Weise unschädlich zu machen. Migrationsdefekte der Leukocyten bedeuten eine schwere Beeinträchtigung ihrer Funktionsfähigkeit und äußern sich in einer erhöhten Anfälligkeit des Organismus gegenüber Infekten. Umgekehrt läßt eine gesteigerte Migrationsbereitschaft von Leukocyten Rückschlüsse auf entzündliche Vorgänge im Organismus zu.

Im Rahmen des Begriffes "Migration von Leukocyten" werden drei Komponenten unterschieden: Die ungerichtete Bewegung (Spontanbewegung), die durch chemische Wirkstoffe ausgelöste beschleunigte Bewegung (Chemokinetik), und die durch chemische Wirkstoffe ausgelöste richtungsorientierte Bewegung (Chemotaxis). Die Chemotaxis richtet sich gegen einen chemischen Lockstoff (das Chemotaxin), der, um richtungsorientierend zu wirken, in einem Konzentrationsgefälle (der chemotaktische Gradient) vorliegen muß. Ein Leukocyt bewegt sich immer in Richtung der höheren Konzentration eines Chemotaxins.

Testverfahren zur Migrationsmessung auf Membranfilterbasis versuchen die natürlichen Verhältnisse, die Leukocyten während ihrer migratorischen Aktivität in den Geweben des Körpers vorfinden, unter genormten Bedingungen zu simulieren. Die Normierung der Testbedingungen ist die Voraussetzung für die Objektivierung und Vergleichbarkeit von Resultaten. Naturgemäß ist ein wäßriges Milieu Voraussetzung für jedwede Zellfunktion. Ein Membranfilter von genormter Dicke und Porenweite, in welchen die Leukocyten unter definierten Untersuchungsbedingungen einwandern, ersetzt das Maschenwerk der Körpergewebe. Um zu gewährleisten, daß die Zellen aktiv, durch Eigenbeweglichkeit und unter Verformung, in den Membranfilter eindringen, soll die Porenweite des Membranfilters geringer sein als der Durchmesser des untersuchten Zelltyps. Weiters ist erforderlich, diese einwandernden Zellen genormten Mengen von Wirkstoffen, die im weiteren als "Testsubstanzen" bezeichnet werden, auszusetzen, um je nach Fragestellung die Spontanbewegung, die Chemokinetik und/oder die Chemotaxis zu beeinflussen. Menge und Verteilung der in den Membranfilter eingewanderten Leukocyten sind die Meßkriterien ihrer Fähigkeit zur Migration.

Grundsätzlich kann die Migration von Leukocyten in vitro (außerhalb des Organismus) und in vivo (im oder am Organismus selbst) gemessen werden.

Eine Membranfiltermethode zur Messung der Migration amöboid beweglicher Zellen in vitro wurde zuerst von BOYDEN vorgestellt (Boyden, S. V., J. Exp. Med. 115, 453 (1962)). Die Methode wird heute in einer Vielzahl von Varianten angewandt, wobei der Messung der Leukocytenmigration bevorzugtes Interesse zukommt. Im Prinzip besteht die Vorrichtung zur Durchführung ("Boyden-Kammer") aus einer Kammer, die durch einen horizontal eingelegten Membranfilter in zwei Kompartimente unterteilt wird. In das obere Kompartiment kommt eine Suspension der zu untersuchenden Zellen, in das untere wird eine Testsubstanz in Lösung eingegeben. Suspensions- und Lösungsmittel sind physiologische Salzlösungen verschiedenster Zusammensetzung und Zusätze. Eine häufig gewählte Versuchsanordnung besteht darin, die Wirkung eines Chemotaxins mit der einer Leerkontrolle (kein Chemotaxin im unteren Kompartiment) zu vergleichen, um so die Stimulierbarkeit einer Zelle durch ein Chemotaxin gegen ihre Spontanbewegung abzugrenzen. Der nötige chemotaktische Gradient bildet sich dabei zwangsläufig im Membranfilter aus, indem das Chemotaxin aus dem unteren Kompartiment, wo es bei Versuchsbeginn in maximaler Konzentration vorliegt, gegen die Konzentration null im oberen Kompartiment diffundiert. Grundsätzlich kann jede wasserlösliche Substanz als Testsubstanz verwendet werden. Die auf den Membranfilter absinkenden Zellen wandern bei geeigneter Untersuchungstemperatur im Verlauf eines geeigneten Zeitraumes in den Membranfilter ein. Migrationsverhalten und -leistung werden gewöhnlich nach der Zahl und/oder Tiefe ihres Eindringens in den Membranfilter beurteilt, die mikroskopisch bestimmt werden. Auch das Durchwandern des Membranfilters wird von manchen Untersuchern als Meßkriterium herangezogen. Den Varianten des Verfahrens nach BOYDEN ist gemeinsam, daß die Testsubstanz in gelöster Form in das untere Kompartiment eingegeben wird. Die Nachteile davon sind:

- daß das Einfüllen genaues und zeitraubendes Arbeiten erfordert,
- daß je nach Variante der Methode mehr oder weniger große Mengen der oft sehr kostspieligen Testsubstanzen nötig sind,



- daß die Ausbildung eines chemotaktischen Gradienten im Membranfilter durch den Bau der Kammer und durch die Eigenschaften und die Konzentration der Testsubstanz vorbestimmt und darüber hinaus nicht steuerbar ist.

5 Häufig untersuchte Zellen sind Leukocyten aus dem Blut. Bei allen Varianten der Membranfiltermethode nach BOYDEN müssen die Leukocyten vor ihrer Untersuchung von den anderen Zellelementen des Blutes getrennt werden. Die Isolierung geschieht mittels verschiedener, meist auf der Basis einer Sedimentation und Zentrifugation beruhender Verfahren. Eine Isolierung bedeutet weitere Nachteile für das Verfahren:

- 10 - hoher Zeitaufwand,
- teure Trennmedien für die Zentrifugation,
- relativ große erforderliche Blutmengen,
- Vorschädigung der Zellen durch den Isoliervorgang, wodurch die Aussagekraft von Zellreaktionen abnimmt.

15 Membranfiltermethoden zur Messung der Zellmigration in vivo sind nicht üblich.

Es ist ein Ziel der Erfindung, die Nachteile herkömmlicher Membranfiltermethoden zu überwinden. Die entscheidende Verbesserung gegenüber den herkömmlichen Methoden und ein wesentliches Merkmal der Vorrichtung besteht darin, daß Membranfilter und Testsubstanz zu einer Einheit verbunden sind, die im folgenden als "Membranfiltersystem" bezeichnet wird.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform besteht das Membranfiltersystem aus drei Schichten wie Fig. 1 zeigt: Am Membranfilter (1) ist die Trägermatrix (2) für die Testsubstanz(en) angebracht, an der wiederum eine undurchlässige Grenzschicht (3) befestigt ist.

Der Membranfilter nimmt die wandernden Zellen auf. Er besteht bevorzugt aus Kohlenhydratverbindungen wie Zellosederivaten (Acetat, Nitrat), Polycarbonat, oder aus Kunststoffen wie Polyamid oder Polyvinylchlorid.

25 Die Porenweite des Membranfilters richtet sich nach dem untersuchten Zelltyp und der Aufgabenstellung der Untersuchung. Im Falle von Leukocyten haben sich Porenweiten zwischen 1 µm und 8 µm als vorteilhaft erwiesen. Diese Angabe ist kein limitierendes Merkmal der Erfindung, da bei anderen Zelltypen andere Porenweiten günstiger sind.

30 Die Filter können ohne weitere Präparation verwendet werden, oder ihr Maschenwerk kann mit Substanzen beschichtet werden, zu denen die wandernden Zellen gewisse Affinitäten aufweisen, wie Kollagen, Fibrin, Heteroglykane, oder Kohlenhydratpolymere wie Agar.

Als Testsubstanzen werden sinngemäß Wirkstoffe verwendet, welche die Zellmigration in positiver oder negativer Weise beeinflussen. Erfindungsgemäß können alle Wirkstoffe eingesetzt werden, die in festem Aggregatzustand vorliegen und bei Versuchstemperatur wasserlöslich sind. Ein Wirkstoff kann einzeln, oder es können mehrere Wirkstoffe gleichzeitig als Testsubstanzen in die Trägermatrix eingebracht werden.

35 Die Trägermatrix besteht aus porösem Material, in das eine Testsubstanz in festem Aggregatzustand eingelagert werden kann und das in der Lage ist, eine Testsubstanz nach deren Lösung protrahiert freizusetzen. Geeignete Materialien für die Trägermatrix sind poröse Derivate von Dextranen, Stärke, Zellulose, oder Kunststoffe wie Polymethacrylsäureverbindungen und ähnliche.

40 Eine Testsubstanz kann entweder direkt in die Trägermatrix eingebracht werden oder unter Zusatz eines Liberationsstabilisators, der, je nach Eigenschaften und verwendeter Konzentration, eine kontrollierte Lösung und Freisetzung einer Testsubstanz ermöglicht. Als Liberationsstabilisator kann jede Substanz verwendet werden, die eine Testsubstanz ohne deren Veränderung einschließt oder mit ihr mischbar ist und die eine Testsubstanz im wäßrigen Milieu in einer Weise freigibt, daß eine geeignete Konzentration oder ein geeignetes Konzentrationsgefälle (chemotaktischer Gradient) der Testsubstanz im Membranfilter entsteht. Ein Liberationsstabilisator liegt wie die Testsubstanz in fester Form in der Trägermatrix vor. Er kann wasserunlöslich sein, quellbar sein oder sich zusammen mit der Testsubstanz lösen. Geeignete Substanzen sind z. B. quellbare oder wasserlösliche Kohlenhydratpolymere wie Agar, Stärke, Methylzellulose, Guar, Pektin; Eiweißverbindungen wie Gelatine; Kunststoffe wie Polymethacrylsäureverbindungen.

50 Alle für die Erfindung verwendeten Materialien müssen biologisch verträglich sein. Um eine mikroskopische Auswertung der eingewanderten Zellen zu ermöglichen, müssen die verwendeten Materialien lichtdurchlässig sein bzw. durch geeignete Maßnahmen lichtdurchlässig gemacht werden können.

Das Membranfiltersystem kann für die Migrationsmessung amöboid beweglicher Zellen in vitro sowie für die Migrationsmessung von Leukocyten in vivo eingesetzt werden.

55 Die Verwendung des Membranfiltersystems als wesentlicher Bestandteil einer Migrationskammer zur Migrationsmessung amöboid beweglicher Zellen in vitro wird in Fig. 2 dargestellt: Ein Behälterring (4) ist am Membranfilter (5) des Membranfiltersystems (5, 6, 7) befestigt, das somit den Boden der Migrationskammer bildet. Die Suspension der zu testenden Zellen (8) wird in die Migrationskammer eingebracht.

60 Als Anwendungsbeispiel wird eine Kammer zur Messung der Migration von Leukocyten beschrieben: In einer bevorzugten Ausführungsform besteht der Behälter (4) aus einem Kunststoffring mit einem Innendurchmesser



von 5 bis 7 mm. Der Membranfilter (5) ist ein Zellulosenitratfilter von 3 µm Porenweite und 140 µm Dicke. Als Trägermatrix (6) dient ein Zellulosenitrat-Membranfilter von 0.2 µm Porenweite und 140 µm Dicke, die Testsubstanz ist das chemotaktische Tripeptid N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP), das mit Agar als Liberationsstabilisator in die Trägermatrix eingebracht ist. Ein Silikonfilm (7) bildet die undurchlässige

Grenzschicht. Ein Membranfiltersystem ohne FMLP-Beschickung dient als Leerkontrolle.

Zur Messung der Leukocytenmigration kann mit einer physiologischen Salzlösung verdünntes und ungerinnbar gemachtes Blut verwendet werden. (Keine Trennung der einzelnen Zellelemente des Blutes ist nötig.) Zur Füllung einer Migrationskammer genügen 25 bis 50 µl Blut. Nach Einfüllen der Blutprobe in die Kammer dringt die flüssige Komponente durch den Membranfilter hindurch in die Trägermatrix ein und bringt den Agar zum Quellen, der dabei das FMLP freigibt. Das sich lösende FMLP diffundiert in Richtung der Blutprobe und bildet damit im Membranfilter einen chemotaktischen Gradienten, dem FMLP-sensitive Leukocyten, in der Hauptmasse Neutrophile Granulocyten, folgen. Für die Untersuchung menschlicher Leukocyten haben sich die natürliche Körpertemperatur von 37 °C und ein Versuchszeitraum von 90 min. bewährt. Es soll aber betont werden, daß Temperatur und Versuchszeit den untersuchten Zelltypen und der jeweiligen Fragestellung angepaßt werden müssen und daher in weiten Grenzen variieren können. Zahl und Verteilung der Zellen werden nach geeigneter Präparation des Membranfilters mikroskopisch bestimmt. Die Beurteilung der Resultate erfolgt im Vergleich mit den in eine Leerkontrolle eingewanderten Zellen.

Die Migrationskammer mit dem Membranfiltersystem bietet gegenüber den herkömmlichen Membranfiltermethoden eine Reihe von Vorteilen:

- Der Füllvorgang beschränkt sich auf das Einpipettieren der Zellsuspension in die Migrationskammer und kann zeitsparend und problemlos durchgeführt werden.
- Minimale Mengen an Testsubstanz genügen für den Aufbau eines chemotaktischen Gradienten.
- Die Freisetzung der Testsubstanz ist durch die Wahl der Trägermatrix sowie durch die Eigenschaften und Menge des Liberationsstabilisators gut regulierbar. Damit kann auf die Erfordernisse des untersuchten Zelltyps und auf die Besonderheiten der Testsubstanz individuell eingegangen werden. Die Vielzahl der für Matrix und Liberationsstabilisator zur Verfügung stehenden Materialien macht das Verfahren flexibel und bietet die Möglichkeit einer optimalen Anpassung an verschiedenste Problemstellungen.

Neben gereinigten Leukocytenfraktionen des Blutes kann zur Messung der Leukocytenmigration auch Blut ohne weitere Vortrennung der einzelnen Zellelemente verwendet werden. Daraus ergeben sich Einsparungen:

- an Zeit und Arbeitsaufwand,
- kostspielige Trennmedien für das Zentrifugieren entfallen,
- die Blutmengen können auf ein Minimum beschränkt werden,
- überdies entfällt die Vorschädigung der Leukocyten durch einen Trennvorgang.

In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform kann die Migrationskammer als Einweggerät gehandhabt werden: Der Behälterteil wird nach Beendigung des Migrationsversuches vom Membranfiltersystem abgezogen und verworfen, der Membranfilter wird präpariert und die eingewanderten Zellen ausgewertet. Eine Reinigung wie bei den herkömmlichen Migrationskammern entfällt.

Eine weitere erfindungsgemäße Anwendung des Membranfiltersystems ist seine Verwendung zur Messung der Leukocytenmigration in vivo. In einer bevorzugten Ausführung wird das Membranfiltersystem mit dem in Fig. 1 dargestellten Aufbau als rundes Plättchen mit einem Durchmesser um 5 mm direkt auf Schleimhäute aufgebracht. Als gut geeignet für eine solche Applikation haben sich die Augenbindehäute erwiesen. Die Testsubstanz löst sich im wäßrigen Milieu der Tränenflüssigkeit und bildet einen chemotaktischen Gradienten. Als Leerkontrolle werden Plättchen ohne Wirkstoff verwendet. Aus der Schleimhaut wandern Leukocyten in die Membranfilter ein. Die Migrationsleistung wird wie oben für die Migrationskammer beschrieben beurteilt.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Vorrichtung zur Messung der Migration amöboid beweglicher Zellen bestehend aus einem Membranfiltersystem, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Membranfilter (1) in zusammenhängendem Kontakt mit einer Trägermatrix (2) für Testsubstanzen steht, die wiederum an der dem Membranfilter gegenüberliegenden Seite von einer undurchlässigen Grenzschicht (3) nach außen abgeschlossen wird.



2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Membranfilter (1) aus Kohlenhydratverbindungen wie Zellulosenitrat, Zelluloseacetat, aus Polycarbonat oder aus Kunststoffen wie Polyamid oder Polyvinylchlorid besteht.
- 5 3. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Porenweite des Membranfilters (1) geringer als der Durchmesser des zu untersuchenden Zelltyps ist.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Membranfilter (1) keine weitere Präparation aufweist.
- 10 5. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Maschen des Membranfilters (1) mit zellaktiven Substanzen, vorzugsweise mit Kollagen, Fibrin, Heteroglykanen oder mit Kohlenhydratpolymeren beschichtet sind.
- 15 6. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Trägermatrix (2) aus einem porösen Material, das eine Testsubstanz nach deren Lösung protahiert freisetzt, insbesondere aus Derivaten von Dextranen, Stärke, Zellulose, oder aus Kunststoffen wie Polymethacrylsäureverbindungen besteht.
- 20 7. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Trägermatrix (2) Testsubstanzen in festem Aggregatzustand enthält, die bei Versuchstemperatur wasserlöslich sind und die Zellmigration in positiver oder negativer Weise beeinflussen.
8. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Trägermatrix (2) Testsubstanzen ohne weitere Zusätze enthält.
- 25 9. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Trägermatrix (2) Testsubstanzen enthält, die mit Liberationsstabilisatoren wie vorzugsweise Agar, Stärke, Methylzellulose, Guar, Pektin, Gelatine oder Polymethacrylsäureverbindungen versetzt sind.
- 30 10. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die der Trägermatrix (2) aufliegende Grenzschicht (3) aus einem Material besteht, das für Wasser und gelöste Substanzen undurchlässig ist.
11. Vorrichtung zur Messung der Zellmigration in vitro, **dadurch gekennzeichnet**, daß an der Membranfilterseite (5, 6, 7) der Vorrichtung nach Anspruch 1 ein Behälter (4) zur Aufnahme der zu untersuchenden Zellen (8) befestigt ist.
- 35

40

Hiezu 1 Blatt Zeichnung



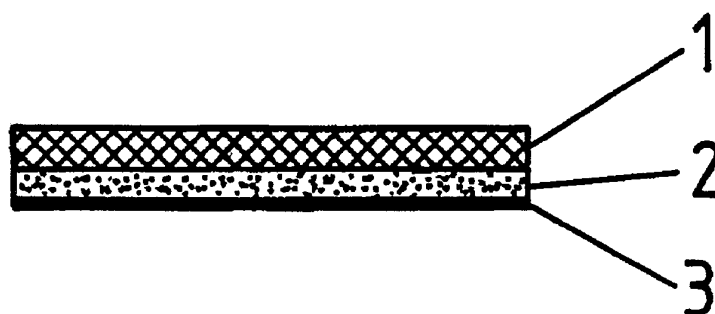


FIG. 1

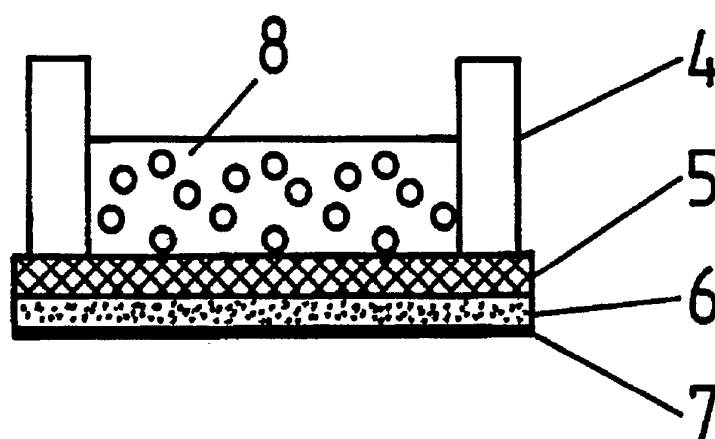


FIG. 2