

Klein, aber oho

Ein Quantensprung im Bereich der medizinischen Diagnostik: mikrofluidische Lab-on-Chip-Systeme.

Weltweit müssen Diagnosen schnell erstellt werden, um eine bestmögliche Therapie zu gewährleisten. Doch nicht nur die Beschleunigung der Prozesse ist Aufgabe der Life-Science-Industrie, sondern auch deren Mobilität. Stellt die Dezentralisierung der Prozesse aus Großlaboren für den Patienten – z.B. nach einer Blutentnahme – bereits einen enormen Fortschritt dar, weil er direkt bei seinem behandelnden Arzt eine aussagekräftige Diagnose erhält, so kann der Faktor Mobilität in ärmeren Ländern und weit entlegenen Regionen die Chance zu einer erfolgreichen Behandlung sein.

Die Lösung sind kleine, mobile Labore, sogenannte Lab-on-Chips, mikrofluidische Reaktionssysteme, welche die Prozesse eines raumfüllenden Labors auf einen chipkartengroßen Einwegartikel miniaturisieren. Passende handliche Geräte lesen die Ergebnisse aus. Doch was in großem Maßstab funktioniert, lässt sich nicht so einfach auf kleinsten Raum verdichten. Hier ist nicht nur mikrofluidische Kompetenz gefragt, sondern auch das Know-How, solche Systeme als Einwegartikel kostengünstig zu produzieren. Es gibt heute mikrofluidische Lab-on-Chips aus Glas bzw. Silizium. Die Mikrostrukturierung dieser Materialien ist hinlänglich bekannt und erprobt – in der Herstellung als Einmalartikel aber viel zu aufwändig und somit teuer.

Können in Kunststoff

Die thinXXS Microtechnology AG ist ein weltweit technologisch führendes Unternehmen, das genau dieses Wissen um mikrofluidische Prozesse, die Entwicklung und Konzeption der Systeme und den kompletten Herstellungsprozess der Artikel im Präzisionsstritzguss anbietet. thinXXS ist in der Lage, extrem feine Strukturen, die das Mischen, Trennen, Filtern, Transportieren und Analysieren kleinster Flüssigkeits- und Gasmengen ermöglichen, von bis zu wenigen Mikrometern in Kunststoff abzubilden. Dabei ist Kunststoff als Material wesentlich effektiver und kann durch den kostengünstigen Stritzguss schnell in großen Mengen produziert werden. Das Unternehmen entwickelt die Lab-on-Chip-Systeme nicht nur, sondern stellt sie auch her.

Wo auch immer mikrofluidische Lab-on-Chip-Systeme und Komponenten aus Kunststoff zum Einsatz kommen werden – es wird ein Quantensprung in der medizinischen Diagnostik.

→ www.thinxxs.de

Der SnakeMix Slide ist Bestandteil des Construction!Kits – dem Mikrofluidik-Baukasten von thinXXS – der eine beschleunigte Entwicklung von Lab-on-chips ermöglicht

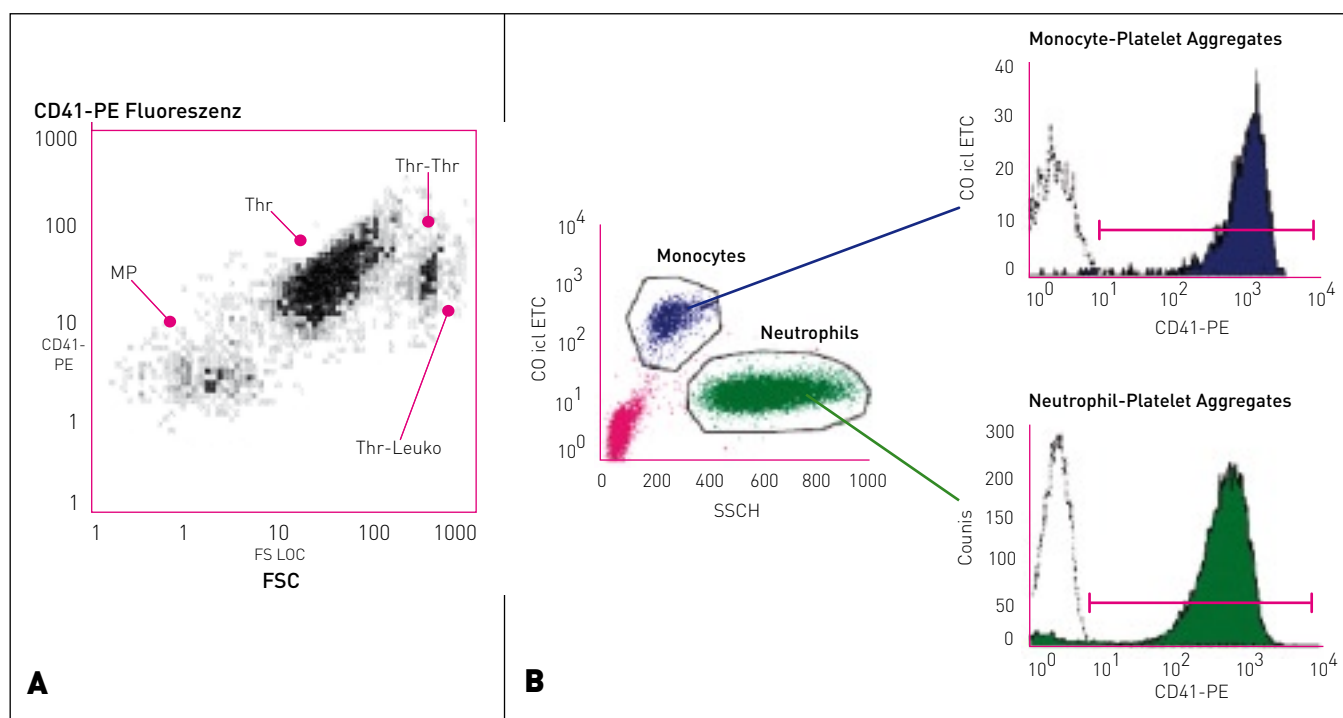


Abb. 1 Differenzierung von Thrombozyten-Thrombozytenaggregaten, thrombozytären Mikropartikeln und Leukozyten-Thrombozytenaggregaten über FCS und thrombozytenspezifische Oberflächenmarker, z.B. CD 41
Abbildungen von A.D. Michelson, *J Path Haem Thromb* 2006; M. Koksob, *Durchflusszytometrische Thrombozytenfunktionsdiagnostik* 1998

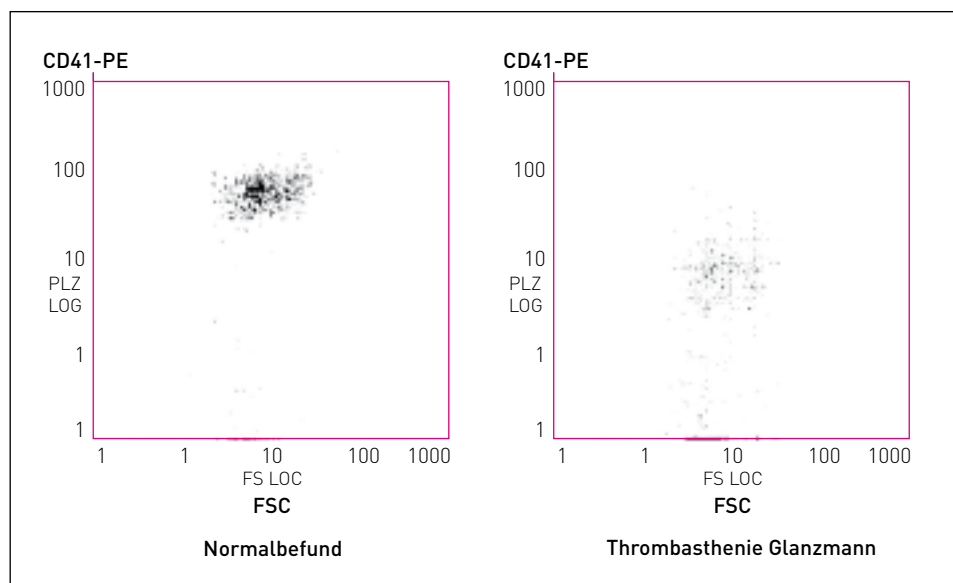


Abb. 2 Beim Normalbefund lässt sich quantitativ eine Aussage über den Thrombozytenspezifischen Oberflächenmarker CD41 machen. Bei der Thrombasthenie Glanzmann ist gekennzeichnet u.a. durch das Fehlen oder die deutliche Reduktion des Fibrinogen-Rezeptors CD 41.

Tab. 1 Beispiele für Phänotyp- und Funktionsparameter der Thrombozyten und deren durchflusszytometrische Marker

Parameter	Marker
Formwandel (Shape change)	FSC und SSC
Anstieg des GPIIb/IIIa-Komplexes	CD41/CD61
Abfall des GPIb/IX/V-Komplexes	CD42
Bildung von Mikropartikeln	FSC versus CD41-Färbung
Marker der δ -Granula	CD62P (GMP-140, P-Selektin)
Marker der lysosomalen Granula	CD63 (Gp53), LAMP-1, LAMP-2
Oberflächenbindung von sezernierten Granulaproteinen	Thrombospondin
Ausbildung negativ geladener Membranbereichen	Annexin V

lectin ist jedoch kein idealer Aktivierungsmarker zur Untersuchung aktivierter bzw. voraktivierter zirkulierender Thrombozyten. In Vivo verlieren aktivierte Thrombozyten P-Selectin von ihrer Oberfläche innerhalb weniger Minuten. In vitro allerdings ist der aktivierungsabhängige Anstieg von P-Selectin auf der Thrombozytenoberfläche irreversibel. D.h. CD62P ist ein geeigneter Marker zur in vitro Funktionsanalyse der Thrombozyten, nicht aber zur Analyse zirkulierender aktivierter Thrombozyten.

Alternativ stellen die Untersuchungen über Monozyten-Thrombozyten- oder Neutrophilen-Thrombozyten Aggregaten sensitive Marker für aktivierte Thrombozyten dar. Hierbei wird über die bekannten Leukozytenpopulationen ein Thrombozyten spezifischer Marker ausgewertet (z.B. CD41, CD42). Es ist bekannt, dass der Anteil von Monozyten mit gebundenen Thrombozyten höher ist als Neutrophilen-Thrombozyten-Aggregate. Weiterhin ist die Halbwertszeit von Monozyten-Thrombozyten-Aggregaten länger als die von Neutrophilen-Thrombozyten-Aggregate und insbesondere länger als 30 min. Somit kann die Analyse von Monozyten-Thrombozyten-Aggregaten ein sensitiver Indikator für in vivo aktivierte, zirkulierende Blutplättchen herangezogen werden. Dies ist bereits in klinischen Studien bei u.a. Herzinfarktpatienten eindrücklich gezeigt worden.

Thrombozytäre Mikropartikel, die von aktivierten Thrombozyten abgegeben werden, um im Blut die für die plasmatische Gerinnung notwendige Phospholipid-

konzentration zu erhöhen, lassen sich über FCS und Thrombozyten spezifische mAb differenzieren und quantifizieren.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Thrombozytenparameter und deren durchflusszytometrischen Marker bzw. monoklonalen Antikörper (mAb) (Abb. 1).

Klinische Einsatzgebiete

Ein grosser Teil der publizierten Studien zur Thrombozytenfunktion wurden bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus durchgeführt. Die Bedeutung der thrombozytären Hyperreagibilität in der Pathogenese und Progression dieser Erkrankungen ist gut belegt. Ein daran sich anschliessendes mögliches Anwendungsgebiet betrifft das Monitoring antithrombozytärer Therapien. Beim gleichzeitigen Einsatz von mehreren antithrombozytären Medikamenten (z.B. ASS, Fibrinogenrezeptorblocker, Thienopyridine) sind durchflusszytometrische Assays für den Wirksamkeitsnachweis und Dosisoptimierung des einzelnen Medikaments gut geeignet – während PFA/Aggregometrie Summationseffekte anzeigen.

Hervorzuheben ist die mögliche Thrombozytenfunktionsanalyse bei thrombozytopenen Patienten, wie sie im Bereich der Hämatologie/Onkologie, bei Leberzirrhose mit sek. portalem Hypertonus, Hypersplenismus oder auch operativen Disziplinen vorkommen können.

Nicht zuletzt ist diese Methode im Bereich der Hämostaseologie zur Analyse angeborener oder erworbener thrombozytärer Rezeptor-/Granuladefekte bei unklarer Blutungsneigungen, sowie zur Differenzierung komplexer Gerinnungsstörungen sehr hilfreich. (Abb. 2). (Methodik: Rezeptor-Analyse (z.B. CD41, CD42, CD49b), Granula-Analyse (CD62P, CD107a/b, Mepacrin-Release), Thrombozytengrösse – Bewertung: Rezeptordichte, induzierter Granula-Release, Thrombozytenaggregate, Mikropartikel).

Zusammenfassend bietet sich eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten in unterschiedlichen klinischen Bereichen, die auch Anregungen für klinische Studien geben können.

→ Varvenne.Michael@mh-hannover.de