

Biochemische Eigenschaften des equinen Autologous Conditioned Plasma® (ACP)

Christina Kissich¹, Jutta Gottschalk², Giesela Lochmann², Almuth Einspanier², Peter Böttcher³, Karsten Winter⁴, Walter Brehm¹ und Jean-Claude Ionita¹

Chirurgische Tierklinik¹, Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut², Klinik für Kleintiere³ und Translationszentrum für Regenerative Medizin (TRM)⁴, Universität Leipzig

Zusammenfassung

Thrombozytenkonzentrate (TZK) werden gegenwärtig in der Pferdeorthopädie häufig therapeutisch eingesetzt. Bei dieser autologen Therapieform werden Thrombozyten (TZ) in das geschädigte Gewebe appliziert, damit sie ihre heilungsfördernden Wachstumsfaktoren (GF) lokal freisetzen können. Zu den wichtigsten GF für die Gewebsregeneration zählen PDGF-BB (platelet-derived growth factor BB) und TGF- β_1 (transforming growth factor β_1). Autologous Conditioned Plasma® (ACP) stellt eine relativ neue, einfache und schnell aufzubereitende Form eines TZK aus der Humanmedizin dar. In dieser Studie kommt ein patentiertes Doppelspritzensystem (ACP®-Spritzen) zum Einsatz, dessen optimale Zentrifugationsparameter (Laufzeit und Umdrehungen/Min (U/min)) für die ACP-Herstellung aus Pferdeblut etabliert werden sollen. Diese Parameter wurden anhand der Blutzellen- und GF-Konzentrationen im ACP im Vergleich zu den Basiswerten im Vollblut bestimmt. Im ersten Teil der Studie wurde von zehn gesunden Warmblutpferden ein großes Blutbild angefertigt, um die Basiswerte der Blutzellkonzentration zu erhalten. Die Blutentnahme für die ACP-Proben erfolgte in den ACP®-Spritzen. Pro Pferd wurden zwölf Proben entnommen. Die Aufbereitung jeder Probe erfolgte in zwölf verschiedenen Varianten, wobei jeweils unterschiedliche Zentrifugationsparameter gewählt wurden (U/min; Laufzeit). Folgende Parameter wurden getestet: 900 (± 127 xg), 1100 (± 189 xg), 1300 (± 265 xg) und 1500 (± 352 xg) U/min mit einer Laufzeit von 4, 5 bzw. 6 Minuten. In jeder ACP-Probe wurden die Blutzellkonzentrationen gemessen und mit den Basiswerten, die vorab im Vollblut bestimmt wurden, verglichen. Daraus resultierte die Bestimmung der Konzentrationen von PDGF-BB und TGF- β_1 nach drei verschiedenen Zentrifugationsregimen (900 U/min x 4 min, 1100 U/min x 5 min und 1300 U/min x 6 min) und deren vergleichende Betrachtung. Im zweiten Teil der Studie wurde konventionelles Plasma von zehn anderen gesunden Warmblutpferden hergestellt und die Blutzellenkonzentrationen sowie die GF-Konzentrationen (TGF- β_1 und PDGF-BB) mit denen aus einer ausgewählten ACP-Probe (1100 U/min x 5 min) für jedes Pferd verglichen, um die Ergebnisse dieser Studie zu validieren. Mit höherer Umdrehungszahl und längerer Laufzeit konnte ein tendenzieller Abfall der Thrombozyten-(TZ) und Leukozyten-(LZ) Konzentration beobachtet werden, Erythrozyten (EZ) wurden bei jeder Kombination aus dem Plasma eliminiert. Bei der Kombination 1100 U/min x 5 min lag die Erhöhung der TZ-Konzentration bei 149 % (± 20) oder 219 G/L (± 61). Die LZ wurden dabei auf 12% minimiert ($0,79 \times 10^9$ Zellen/L). Die Konzentration von PDGF-BB und TGF- β_1 lagen bei 1,58 ng/ml bzw. 1,40 ng/ml. Zwischen den drei ausgewählten Kombinationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die GF-Konzentration. Im Hinblick auf die TZ-, LZ-, GF-Konzentration ergab die Kombination aus 1100 U/min x 5 min im Gesamtbild die besten Ergebnisse. Die TZ- und GF-Werte im ACP waren signifikant höher verglichen mit jenen im konventionellen Plasma ($p < 0,01$). Darüber hinaus lagen die im Vollblut gemessenen TZ-Konzentrationen signifikant darunter ($p < 0,01$). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen stellt ACP eine praktische und schnelle Aufbereitungsmethode eines TZK für die Pferdemedizin dar. Für die optimale Aufbereitung kann auf Grund der TZ-, LZ- und GF-Konzentrationen eine Kombination von 1100 U/min x 5 min für die praktische Anwendung beim Pferd empfohlen werden.

Schlüsselwörter: Pferd, PRP, ACP, Thrombozyten, Wachstumsfaktoren, Orthopädie, Therapie, regenerativ

Biochemical characteristics of the equine Autologous Conditioned Plasma® (ACP)

Platelet concentrates (PC) are frequently used as a therapeutic technique in equine orthopaedics. The background of this therapy is the isolation of thrombocytes and their reimplantation into damaged tissues, in order to release their wound healing growth factors (GF). Among others PDGF-BB (platelet-derived growth factor BB) and TGF- β_1 (transforming growth factor β_1) are the most important GFs for tissue regeneration. To obtain PC, Autologous Conditioned Plasma® (ACP) is a relatively new technique, which is easy to use and straight forward. ACP is compounded by using a patented double-syringe system (ACP® syringe). As it was originally designed for the use in human medicine, optimal centrifugation parameters (duration (min) and rotations per minute (rpm)) have not been established for production of equine ACP yet. To set up centrifugation parameters, blood cell and GF concentrations in ACP were compared to their baseline values in whole blood. In the first part of the study, a haemogram from ten healthy Warmblood horses was performed to get the baseline values of blood cell concentrations. The blood samples for ACP processing were prepared in the ACP® syringes. From all horse included, twelve blood samples were taken to obtain ACP. Each of these samples was prepared in one of twelve different variants with different centrifugation parameters (rpm, run time). Following parameters were chosen: 900 (± 127 x g), 1100 (± 189 x g), 1300 (± 265 x g) and 1500 (± 352 x g) rpm with a run time of 4, 5 or 6 minutes. In each ACP sample, blood cell concentrations were compared with the baseline values, which were first determined in whole blood. Afterwards the concentrations of PDGF-BB and TGF- β_1 of three selected centrifugation combinations (900 rpm x 4 min, 1100 rpm x 5 min and 1300 rpm x 6min) were compared. In the second part of this study, conventional plasma from ten other healthy Warmblood horses was prepared and blood cell concentrations and GF concentrations (TGF- β_1 and PDGF-BB) determined. These results were compared with those from one selected ACP sample (1100 rpm x 5 min) in order to validate the results of this study. With an increase of duration time and rpm of the centrifugation, a non-significant decrease in TC and leucocyte (LC) concentrations was observed. Erythrocytes (EC) could be eliminated from each plasma sample of the three combinations. The combination 1100 rpm x 5min showed a TC concentration increase of 149% (± 20) or 219G/L (± 61). LC concentration was thereby diminished to 12% (0.79×10^9 cells/L). The concentration of PDGF-BB was 1.58 ng/ml and the concentration of TGF- β_1 was 1.40 ng/ml. No significant differences were found between the three selected combinations in regard to their GF concentration. In general view, the relatively mild centrifugation combination 1100 rpm x 5 min showed the best results in terms of TC, LC and GF concentrations compared to the other combinations. TC and

GF values in ACP were significantly higher compared with those in conventional plasma ($p < 0.01$). Moreover, TC concentrations in whole blood were significantly lower ($p < 0.01$). According to these results, ACP is a practical and straight forward method to obtain a PC for equine medicine. Based on the TC, LC and GF concentrations, the combination 1100 rpm x 5 min can be recommended for the practical application in horses.

Keywords: horse, PRP, ACP, platelets, growth factors, orthopedics, therapy, regenerative

Einleitung

Thrombozytenkonzentrate (TZK), auch thrombozytenangereichertes Plasma, „platelet rich plasma“ oder „plasma rich in growth factors“ genannt, werden in der Pferdemedizin in zunehmendem Maße therapeutisch erfolgreich eingesetzt (Argüelles et al. 2006). Dieses regenerativmedizinische Verfahren wird schon seit 1990 in der Humanmedizin verwendet, um die Wundheilung in bestimmten Gewebearten zu fördern (Sanchez et al. 2009, Castillo et al. 2011). Typische Indikationen in der Veterinärmedizin sind orthopädischen Ursprungs und umfassen pathologische Zustände wie Tendinitiden, Osteoarthritis, Synovitiden und Insertionsdesmopathien. Das Prinzip dieser autologen Therapieform besteht darin, die Thrombozyten (TZ) aus dem körpereigenen Blut des Patienten zu isolieren und sie in das geschädigte Gewebe zu reapplizieren, damit sie nach Aktivierung ihre heilungsfördernden Wachstumsfaktoren lokal freisetzen können (Eppley et al. 2004, Weinberger 2008).

TZK stellen eine Volumenfraktion aus autologem Plasma dar, die idealer Weise hohe Konzentrationen an TZ und Wachstumsfaktoren (GF), aber keine Erythrozyten (EZ) und nur geringe Konzentrationen an Leukozyten (LZ) beinhalten (Mos et al. 2008, Argüelles et al. 2008). TZ sind kernlose Zytoplasmfragmente, die durch den Zerfall von Megakaryozyten im Knochenmark entstehen und eine zentrale Funktion bei der Koagulation einnehmen (Clemmons et al. 1983). Zudem spielen sie eine sehr wichtige Rolle beim Vorgang der Wundheilung (Liebich 2003). Die in den TZ enthaltenen α -Granula beinhalten viele verschiedene GF und zahlreiche andere Zytokine, die normalerweise erst durch die Aktivierung der TZ freigesetzt werden (Argüelles et al. 2006, Sutter et al. 2004). Diese Aktivierung geschieht durch spezifische Thrombozytenagonisten (Thrombin, Kollagen, Kalzium, ADP, Thromboxan A₂, Noradrenalin, Serotonin), aber auch durch mechanischen „Scherkontakt“ (Schrör 2001, Eppley et al., 2004). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Konzentration an GF in TZK direkt proportional zur TZ-Konzentration ist (Argüelles et al. 2006, Weibrich et al. 2002). Zwei wichtige GF für die Gewebsregeneration stellen PDGF-BB (platelet-derived growth factor BB) und TGF- β_1 (transforming growth factor β_1) dar. Während PDGF-BB vor allem ein sehr guter Chemoattraktor ist und die Zellproliferation stimuliert (Anitua et al. 2004), ist TGF- β_1 insbesondere für die Steigerung der Kollagensynthese verantwortlich (Haber et al. 2003).

Platelet rich plasma (PRP) ist die älteste und bekannteste Form eines TZK. Per Definition nach Marx (2001) muss die Konzentration an TZ im PRP vier- bis achtmal so hoch im Vergleich zum Vollblut sein (Marx 2001). Hall et al. (2009) definieren PRP als Plasma, dessen TZ-Konzentration oberhalb der TZ-Basalwertkonzentration im Vollblut liegt (Hall et al. 2009). Ein weiteres charakteristisches Merkmal des PRP ist die GF-Konzentration. Diese ist im PRP signifikant höher als im Vollblut (Mos et al. 2008). Für die Herstellung von PRP gibt es

drei verschiedene Möglichkeiten: Herstellung mittels Doppelzentrifugationsverfahren, durch eine biochemische („Buffy-Coat“) Aufbereitungsmethode oder durch Plasmapherese (Kon et al. 2009). In den letzten Jahren wurden viele kommerzielle Verfahren entwickelt, die jedoch teilweise Nachteile aufweisen und zum Teil kostenintensiv sind (Appel et al. 2002). In der Pferdemedizin hat sich vor allem die Doppelzentrifugationsmethode durchgesetzt, da sie relativ einfach, preiswert und schnell ist. Argüelles et al. (2006) haben eine standardisierte pferdespezifische Technik beschrieben, bei der Vollblut in Plastikröhrchen (Citrat als Gerinnungshemmer) entnommen, und zuerst bei 120 xg für 5 Minuten zentrifugiert wird. Anschließend werden 50 % des Plasmaüberstandes, der sich unmittelbar oberhalb des „Buffy Coats“ befindet abgenommen und in ein neues Plastikröhrchen umgefüllt. Danach erfolgt die zweite Zentrifugation mit 240 xg für 5 Minuten. Die unteren 25 % dieser zweiten Plasmafraktion werden dann als PRP angesehen. Der Rest des Plasmavolumens wird als „platelet poor plasma“ (PPP) bezeichnet (da es weniger TZ enthält) und verworfen. Das gewonnene PRP zeigt nicht nur eine Erhöhung der TZ, sondern auch eine hohe Konzentration an LZ, und kann somit lokale Entzündungsreaktionen begünstigen (Argüelles et al. 2006).

Autologous Conditioned Plasma[®] (ACP[®], Arthrex GmbH, Deutschland) stellt eine neue und in der Aufbereitung vereinfachte Form eines TZK dar. Hierfür wird ein patentiertes Doppelspritzenystem angewendet, bei dem nur ein einziger Zentrifugationsschritt für die Plasmaherstellung erforderlich ist. Im Unterschied zu anderen TZK wird bei der ACP-Therapie dem Patienten das gesamte Plasma injiziert. Somit ergibt sich eine geringere TZ-Konzentration bei gleichzeitig höherem Plasmavolumen im Vergleich zu PRP, das mittels Doppelzentrifugation hergestellt wurde. Es kann eine fast vollständige Elimination von EZ und LZ bei Erhalt der TZ erzielt werden (Perotta und Snyder 2007).

Buhr und Siekmann (2009) haben in einer humanmedizinischen Studie über die Optimierung des ACP-Aufbereitungsverfahrens gezeigt, dass es bei einer bestimmten relativen Zentrifugalbeschleunigung (RCF) zu einer Verdopplung der TZ- und zu einer Erhöhung der GF-Konzentrationen im ACP kommt. Für die Erzeugung von humanem ACP wird vom Hersteller eine Zentrifugation bei 1500 U/min für 5 Minuten angegeben. Dies entspricht einer RCF von 352 xg bei Verwendung der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Zentrifuge Rotofix 32 A (Buhr und Siekmann 2009). Die speziesspezifischen hämorrheologischen Eigenschaften, die vor allem durch Aggregationsneigung und Verformbarkeit der EZ, durch die TZ-Aggregation, die Temperatur, den Hämatokrit, die Viskosität des Blutplasmas und das Gewicht der Zellen bestimmt werden, sind für die Aufbereitung von TZK mittels Zentrifugation ausschlaggebend. Equine und humane TZ verhalten sich in der Sedimentation demzufolge unterschiedlich (van Wie und Hustvedt 1988, Clemmons et al. 1983). In der Studie von Argüelles et al. (2006) wurde bewiesen, dass sich

das humanmedizinische Protokoll der PRP-Herstellung von *Anitua* (1999) nicht für Pferde eignet. Es wird daher davon ausgegangen, dass die vom Hersteller angegebenen Parameter für die Herstellung von humanem ACP für Pferde nicht geeignet sind.

Das Ziel dieser Studie bestand darin, die optimalen Parameter der Zentrifugation für die ACP-Herstellung aus Pferdeblut zu etablieren. Diese Parameter wurden anhand der TZ-, LZ-, EZ- und GF-Konzentration (PDGF-BB und TGF- β_1) abgeleitet. Angestrebt wurden hohe TZ- und GF-Konzentrationen bei gleichzeitig niedrigen EZ- und LZ-Konzentrationen. Des Weiteren wurden die Konzentrationen von PDGF-BB und TGF- β_1 in equinem ACP gemessen und mit der in konventionell hergestelltem Plasma verglichen, um die GF-Messungen zu validieren.

Material, Tiere und Methode

Bestimmung der optimalen Parameter für die ACP-Aufbereitung

Im Rahmen einer genehmigten Tierversuchsanzeige (V10/11) wurden für die Studie zehn Warmblutpferde (mittleres Alter 12 ± 7 Jahre; 5 Stuten und 5 Wallache) herangezogen. Diese waren Patienten der Chirurgischen Tierklinik der Universität Leipzig. Kriterium für die Auswahl der Probanden war ihre gesundheitliche Eignung, das heißt, die Tiere wiesen keine systemischen Erkrankungen auf und hatten keine vorausgegangene Medikation erhalten.

Für die Blutentnahme wurde die Drosselrinne im Bereich der Vena jugularis im oberen Drittel geschoren und aseptisch vorbereitet. Danach wurde ein 14 gauge Venenkatheter (Braunüle Vasocan, B. Braun AG, Melsungen) kopfwärts in die Vene eingebracht und fixiert.

Von jedem Pferd wurde ein großes Blutbild angefertigt, um Basalwerte der Blutzellkonzentrationen zu erhalten. Für die weiteren Untersuchungen war es notwendig, die EZ-, LZ- und TZ-Konzentrationen sowie den Hämatokritwert zu bestimmen. Das Blut dafür wurde in konventionell erhältliche EDTA-Röhrchen (Henry Schein Vet GmbH, Deutschland) entnommen. Alle hämatologischen Untersuchungen erfolgten automatisiert mittels Zellcounter (ADVIA® 120, Siemens, Deutschland). Um ACP aufzubereiten, wurde das patentierte Doppelspritzenystem (ACP®, Arthrex GmbH, Deutschland) verwendet. Die Doppelspritzen bestehen aus einer größeren (12 ml) und einer kleineren (5 ml) Spritze, die ineinander geschraubt sind. Die größere Spritze dient zur Blutentnahme. Mit der kleineren innen liegenden Spritze wird nach Zentrifugation aus der großen Spritze der Plasmaüberstand abgezogen. In die ACP®-Doppelspritzen wurden unmittelbar vor der Blutentnahme 1 ml des Antikoagulans Citrat-Dextrose (noClot-400®) in die äußere größere Spritze aufgezogen und gleich danach wurden je 9 ml Blut langsam dazu aufgezogen und vorsichtig mit dem Antikoagulans durchmischt.

Für die zu testenden ACP-Aufbereitungsparameter wurden von jedem Probanden insgesamt 12 ACP®-Doppelspritzen im Abstand von etwa 10 Minuten zur weiteren Verarbeitung entnommen. Um eine Koagulation des Blutes im Venenkatheter

zu vermeiden, wurde der Katheter nach jeder Blutentnahme mit physiologischer Kochsalzlösung gespült.

Nach der Blutentnahme wurden die mit Blut gefüllten Spritzen zuerst vorsichtig in die dafür vorgesehenen Zentrifugeneinsätze eingebracht und danach sofort zentrifugiert (kurze Auslaufzeit der Zentrifuge, wie vom Hersteller angegeben). Alle Proben wurden in der Zentrifuge Rotofix 32 A (Hettich, Zentrifuge Rotor 1324, Innsbruck, Österreich) aufbereitet.

Die Blutproben wurden nach der Entnahme unverzüglich unter folgenden Parametern bearbeitet: Jede der 12 Proben pro Pferd wurde mit einer von 12 verschiedenen Kombinationen aus Umdrehungszahl und Laufzeit zentrifugiert. Die angewandten Varianten umfassten 4 verschiedene Umdrehungszahlen 900 (± 127 xg), 1100 (± 189 xg), 1300 (± 265 xg) und 1500 (± 352 xg) sowie drei verschiedene Laufzeiten von 4, 5 und 6 Minuten. Die Berechnung der relativen Zentrifugalbeschleunigung (RCF) wurde über folgende Formel vorgenommen:

$$RCF = (RPM/1000)^2 \times r \times 1,118$$

(RPM=Drehzahl/min; r=Distanz von der Mitte des Rotors bis zum Gefäßboden (bei Rotofix 32 A) 140 mm)

Die Kombinationen aus RCF und Laufzeit wurden anhand von präliminären unpublizierten Ergebnissen gewählt (unpublished Data, Ionita). Durch zu starke Zentrifugation und dadurch entstehende mechanische Einwirkung auf die TZ können diese aktiviert werden und deren GF eventuell vorzeitig freigesetzt werden (Schrör 2001). Deswegen wurde auf kurze Zentrifugationslaufzeit und eine schonende Zentrifugation speziellen Wert gelegt. Nach der Zentrifugation wurde der Plasmaüberstand mit der inneren Spritze behutsam abgezogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Untersucher den sehr dünn ausfallenden „Buffy Coat“ und die EZ-Fraktion nicht mit aufzieht.

Jede ACP-Probe wurde anschließend einem Hämogramm unterzogen, mit besonderem Augenmerk auf TZ-, LZ-Konzentration und Hämatokrit. Alle Proben wurden automatisiert mittels Zellcounter (ADVIA® 120; Siemens, Deutschland) analysiert. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmungen, aus denen jeweils der Mittelwert ermittelt wurde. Diese Ergebnisse wurden dann nach Verdünnungskorrektur mit den Basiswerten des Vollblutes verglichen (90 % Blut, 10 % A-CDA).

GF -Bestimmung

Es wurde ein Vergleich der Konzentrationen von PDGF-BB und TGF- β_1 nach drei verschiedenen Zentrifugationsregimen vorgenommen. Diese wurden auf Grund der vorangehenden Zellzahlbestimmungen (TZ und LZ) gewählt. Von den ausgewählten Proben (900 U/min x 4 min, 1100 U/min x 5 min und 1300 U/min x 6 min) wurden je 4 Aliquots zu 0,5 ml zur GF-Bestimmung bei -80 °C eingefroren. Für die Analysen von PDGF-BB und TGF- β_1 wurden kolorimetrische „Sandwich“ Elisa Kits (ELISA, Quantikine Human TGF- β_1 und ELISA, Quantikine Human PDGF-BB; R&D Systems, Minneapolis) verwendet, die für humane Plasmaproben validiert sind. Zur Bestimmung von PDGF-BB in Citratplasma lag keine Validierung vor.

Assayspezifische Kriterien

Der Hersteller gibt für den humanen PDGF-BB- ELISA eine Intraassay Varianz zwischen 2,3 % und 4,5 % sowie eine Interassay Varianz zwischen 7,4 % und 8,3 % für Serum und Plasma an. Da diese Werte nur für humane ELISA-Kits gültig sind, wurde für die hier durchgeführten Messungen eine equine Kontrollprobe mitgeführt. Diese Kontrollprobe wurde vor Versuchsbeginn gewonnen, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Bei jeder Versuchsreihe wurde je ein Aliquot als Kontrollprobe eingesetzt. Für die Kontrollproben ließ sich bei drei Ansätzen keine Interassay-Varianz ableiten.

Die Wiederfindungsrate (Recovery) von PDGF-BB betrug 88-115 %, die Sensitivität 15 pg/ml. Für TGF- β_1 lagen die entsprechenden Angaben bei 86-115 % bzw. 4,61 pg/ml. Sämtliche Analysen erfolgten in Doppelbestimmung.

Vergleich der Wachstumsfaktorenkonzentration zwischen ACP und konventionell hergestelltem Plasma

Für den zweiten Teil dieser Studie wurden 10 weitere, gesunde Warmblutpferde (mittleres Alter $12 \pm 7,0$ Jahre; 5 Stuten, 4 Wallache und 1 Hengst) im Rahmen einer genehmigten Tierversuchsanzeige (V10/11) herangezogen. Die Probanden waren Patienten der Chirurgischen Tierklinik der Universität Leipzig. Kriterium für die Auswahl der Probanden war auch hier der Ausschluss jeglicher systemischer Erkrankungen und vorausgegangener Medikation.

Von jedem Pferd wurde wie im ersten Versuchsteil zunächst ein großes Blutbild (Zellcounter ADVIA[®] 120; Siemens, Deutschland) angefertigt. Das Blut dafür wurde in konventionell erhältliche EDTA-Röhrchen (Henry Schein Vet GmbH, Deutschland) entnommen. Die ermittelten Werte dienten in weiterer Folge als Basalwerte. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die LZ- und TZ-Konzentration sowie den Hämatokrit gelegt. Danach wurde konventionelles, möglichst „zellfreies“ Plasma hergestellt. Dafür wurden 9 ml Blut in ein Röhrchen mit 1 ml Natriumcitrat (S-Monovette[™], Sarstedt, Nümbrecht) entnommen und anschließend bei 3000 xg für 10 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Eppendorf 5403, Eppendorf AG, Hamburg).

Die Herstellung des ACP erfolgte wie oben beschrieben. Für diesen Teil der Studie wurde jeweils nur eine ACP-Probe pro Pferd bei 1100 U/min x 5 min erzeugt. Von jeder der beiden Plasmaproben wurde ein großes Blutbild angefertigt und danach aliquotierte Anteile von 0,5 ml für weitere Analysen bei -80°C eingefroren. Die anschließende Bestimmung der GF-Konzentrationen wurde sowohl für das konventionell hergestellte Plasma als auch für das ACP durchgeführt. Die Messung von TGF- β_1 und PDGF-BB erfolgten wie oben beschrieben.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 15 (IBM Deutschland GmbH) durchgeführt. Alle Versuchsgruppen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft und anschließend mittels ONEWAY ANOVA und Post

Hoc nach Bonferroni auf signifikante Unterschiede untersucht. Die bivariate Korrelationsanalyse wurde unter Verwendung des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Das zweiseitige Signifikanzniveau für alle Tests und Korrelationen betrug $p < 0,05$.

Ergebnisse

Methodik und System

Die ACP-Aufbereitung erwies sich als schnell und einfach. Die Pferde tolerierten die Blutentnahme mit diesem System sehr gut. Die Herstellung einer ACP-Probe dauerte von der Abnahme bis zum fertig aufbereiteten Plasma ungefähr 10 Minuten. Die Anwendung des Doppelspritzensystems erlaubte eine schnelle und saubere Aufbereitung des ACP. Das entstandene Plasmavolumen betrug pro Probe in etwa 5 bis 6 ml (je nach Hämatokritwert des Pferdes). Die Zellzählung konnte problemlos mittels Zellzähler durchgeführt werden und ergab konstante Ergebnisse, mit Ausnahme eines Patienten, der klinisch unlogische Werte lieferte. Die Werte dieses Probanden wurden in die Auswertung nicht einbezogen. Die Ergebnisse der TZ-Konzentrationen für die Basiswerte im Vollblut zeigten – bezogen auf alle Pferde – hohe tier-individuelle Schwankungen in den Zellzahlen.

Bestimmung der optimalen Parameter für die ACP-Aufbereitung

Zentrifugationsmethoden

Die Hämatokritwerte im ACP waren signifikant ($p < 0,01$) niedriger als im Vollblut, die EZ konnten in den ACP-Proben nahezu vollständig eliminiert werden. Die Ergebnisse der 12 verschiedenen Zentrifugationsmethoden sind in Tab.1 zusammengefasst. Es werden absolute und relative (prozentuell, im Vergleich zum Vollblut) Messwerte der TZ- und LZ-Konzentrationen angegeben. Dargestellt werden die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SW) der TZ- und LZ-Konzentrationen der 9 Pferde.

Bei jeder der 12 Zentrifugationskombinationen konnte stets eine höhere TZ- Konzentration und geringere LZ-Konzentration im Vergleich zu Vollblut nachgewiesen werden. Alle Ergebnisse waren signifikant höher (TZ) bzw. geringer (LZ) als im Vollblut ($p < 0,05$). Mit höherer Umdrehungszahl und längerer Laufzeit konnte sowohl ein tendenzieller Abfall der TZ (Abb. 1) als auch der LZ (Abb. 2) beobachtet werden. Die Zentrifugationskombinationen 900 U/min x 4 min, 1100 U/min x 5 min und 1300 U/min x 4 min zeigten die höchsten TZ-Werte. Dabei unterschied sich die Zentrifugation 900 U/min x 4 min von den Zentrifugationen 1300 U/min x 6 min, 1500 U/min x 5 min und 1500 U/min x 6 min hoch signifikant ($p < 0,01$).

Die Zentrifugationsvariante 900 U/min x 4 min zeigte die höchste Konzentration an TZ, jedoch auch die höchste Konzentration an LZ (Tab.1). Diese hohe Konzentration der LZ bei der Kombination 900 U/min x 4 min war statistisch als hoch signifikant ($p < 0,01$) im Vergleich zu den anderen Zentrifugationen einzustufen. Bei der Kombination 1100 U/min x 5 min zeigte

Tab 1 TZ & LZ mit Mittelwert und Standardabweichung (MW±s) der 12 verschiedenen Zentrifugationen der 9 Pferde; relative (REL) und absolute (ABS) Werte) (n=9) für die ACP-Aufbereitung

| ZF U/min x Zeit (min) | TZ x 10 ⁹ Zellen/L (ABS) | TZ % (REL) | LZ x10 ⁹ Zellen/L (ABS) | LZ % (REL) |
|-----------------------|-------------------------------------|------------|------------------------------------|------------|
| 900x4 | 239 ± 71 | 160 ± 22 | 2,3 ± 0,9 | 35,5 ±15,8 |
| 900x5 | 234 ± 64 | 158 ± 21 | 1,6 ± 0,6 | 24,8 ± 4,6 |
| 900x6 | 224 ± 63 | 148 ± 25 | 1,3 ± 0,6 | 19,1 ± 5,4 |
| 1100x4 | 231 ± 62 | 158 ± 22 | 1,2 ± 0,4 | 17,9 ± 4,2 |
| 1100x5 | 219 ± 61 | 149 ± 20 | 0,8 ± 0,3 | 11,9 ± 3,9 |
| 1100x6 | 208 ± 53 | 141 ± 19 | 0,5 ± 0,3 | 6,7 ± 3,6 |
| 1300x4 | 220 ± 61 | 152 ± 21 | 0,4 ± 0,3 | 5,5 ± 3,2 |
| 1300x5 | 199 ± 58 | 136 ± 17 | 0,3 ± 0,2 | 4,0 ± 2,4 |
| 1300x6 | 177 ± 47 | 123 ± 20 | 0,2 ± 0,1 | 2,6 ± 1,4 |
| 1500x4 | 201 ± 59 | 139 ± 19 | 0,2 ± 0,1 | 3,3 ± 1,5 |
| 1500x5 | 175 ± 51 | 123 ± 20 | 0,1 ± 0,1 | 1,3 ± 1,02 |
| 1500x6 | 159 ± 49 | 112 ± 20 | 0,1 ± 0,1 | 0,01 ± 0,0 |

ZF, Zentrifugation; TZ, Thrombozyten; LZ, Leukozyten

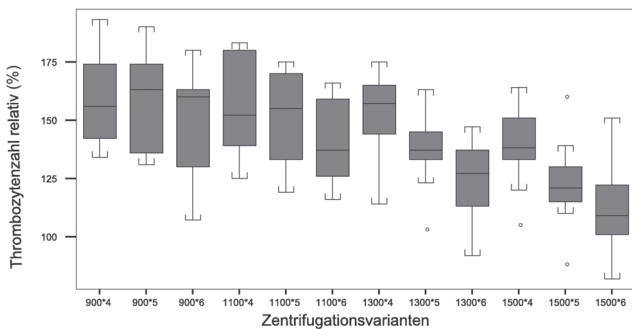


Abb. 1 Zentrifugationskombinationen; relative TZ Konzentrierung (n=9)
Centrifugation combinations; relative platelet concentration (n=9)

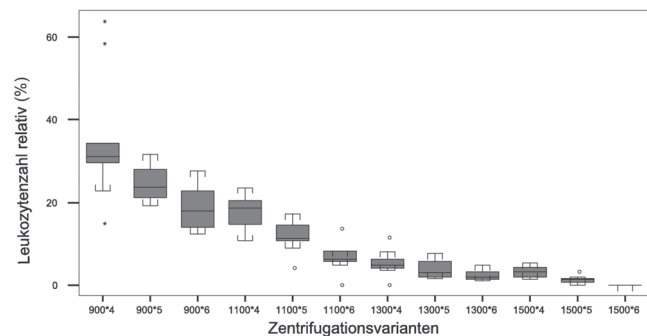


Abb. 2 Zentrifugationskombinationen; relative LZ Konzentrierung (n=9)
Centrifugation combination; relative leucocyte concentration (n=9)

die TZ-Konzentration eine Erhöhung auf 149 %, aber auch eine Erniedrigung der LZ auf 12 % im Vergleich zum Vollblut.

Wachstumsfaktorenbestimmung

Die Bestimmung der Konzentrationen von PDGF-BB und TGF-β₁ mittels kolorimetrischer „Sandwich“ Elisa-Kits erwies sich für das Pferd als geeignet (99% Homologie der Peptide zwischen humanem und equinem Plasma). Trotz zufriedenstellender Ergebnisse der Doppelbestimmungen wurde eine sehr hohe tier-individuelle Streuung der beiden gemessenen GF ermittelt.

In der Tab.2 sind die Ergebnisse von drei Kombinationen (900 U/min x 4 min; 1100 U/min x 5 min; 1300 U/min x 6 min) ersichtlich, für die die Konzentration der GF bestimmt

wurden (TZ, LZ, Hämatokrit (HK), TGF-β₁ und PDGF-BB). Die drei Varianten unterscheiden sich deutlich in RCF und Laufzeit. Die erste gewählte Kombination (900 U/min x 4min) stellt eine sehr schonende Zentrifugation des Plasmas dar, woraus jedoch eine relativ hohe LZ-Zahl resultierte. Jedoch ergibt dieses aber im Vergleich zu den anderen Varianten die höchsten Werte für die GF. Bei der dritten Zentrifugationsvariante mit deutlich höherer Drehzahl (1300 U/min x 6 min) konnten fast alle LZ eliminiert werden, dabei wurde jedoch auch die TZ- und GF-Konzentration deutlich herabgesetzt. Die mittlere Variante (1100 U/min x 5 min) erwies sich als die geeignete Kombination bezüglich höherer TZ- und GF- bei relativ niedrigen LZ- Werten. Die Ergebnisse der GF der drei Kombinationen unterschieden sich jedoch statistisch nicht signifikant voneinander (p>0,05) (Abb. 3). Der HK-Wert zeigt, dass bei jeder Kombination die EZ fast vollständig eliminiert wurden.

Tab. 2 TGF-β₁ und PDGF-BB Konzentration incl. Hämatokrit mit Mittelwert und Standardabweichung (MW±s) der (n=9) relativen (REL) TZ und LZ-Werte des ACP

| ZF U/min x Zeit (min) | TZ % (REL) | LZ % (REL) | HK L/L | TGF-β ₁ xVF5 ng/ml | PDGF-BB xVF5 ng/ml |
|-----------------------|------------|------------|--------------|-------------------------------|--------------------|
| 900x4 | 160 ±22 | 35,5 ±15,8 | 0,002 ±0,001 | 1,70 ±0,08 | 1,88 ±0,07 |
| 1100x5 | 149 ±20 | 11,9 ±3,9 | 0,001 ±0,0 | 1,40 ±0,08 | 1,58 ±0,07 |
| 1300x6 | 123 ±20 | 2,6 ±1,4 | 0,001 ±0,0 | 1,14 ±0,08 | 1,24 ±0,03 |

ZF, Zentrifugation; TZ, Thrombozyten; LZ Leukozyten; VF Verdünnungsfaktor; HK Hämatokrit

Obwohl bei den höchsten TZ-Werten auch die höchsten Konzentrationen an GF nachgewiesen werden konnten, besteht keine Korrelation zwischen den TZ- und GF-Werten (PDGF-BB $r = 0,05$; TGF- β_1 $r = 0,03$). Ebenso war keine Korrelation zwischen den LZ- und GF-Konzentrationen nachweisbar (PDGF-BB $r = 0,11$; TGF- β_1 $r = 0,08$).

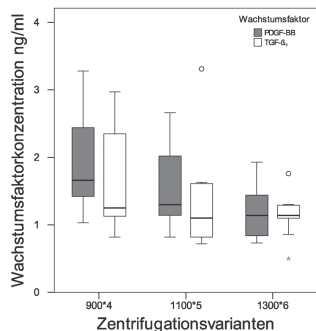


Abb. 3 Konzentration der Wachstumsfaktoren PDGF-BB (ng/ml) und TGF- β_1 (ng/ml) bei drei verschiedenen Zentrifugationsvarianten (n=9)

Concentration of the growth factors PDGF-BB (ng/ml) and TGF- β_1 (ng/ml) from three different centrifugations (n=9)

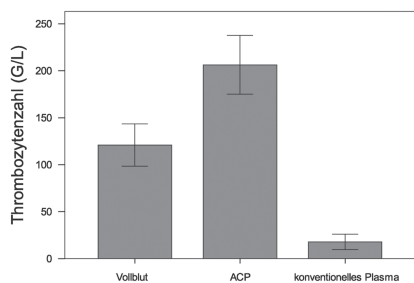


Abb. 4 TZ-Konzentrationen im Vollblut, ACP und konventionell hergestelltem Plasma (n=10)

Platelet concentration in whole blood, ACP and conventionally prepared plasma (n=10)

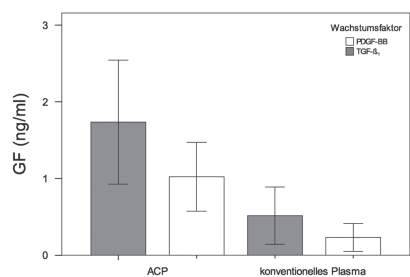


Abb. 5 GF-Konzentration (TGF- β_1 und PDGF-BB) im konventionell hergestelltem Plasma und ACP ($p < 0,01$)

Concentration of the growth factors (TGF- β_1 and PDGF-BB) in conventionally prepared plasma and ACP ($p < 0,01$)

Vergleich der TZ-, LZ- und GF- Konzentration sowie des HK-Wertes zwischen ACP und konventionell hergestelltem Plasma

TZ-, LZ- und HK-Wert wurde für Vollblut in EDTA und für Plasma in Citratblut bestimmt. Die Werte erwiesen sich als konstant und als für das Pferd gut messbar. Die Messungen des HK-Wertes im ACP und in konventionell hergestelltem Plasma zeigten niedrigere Werte verglichen mit Vollblut, diese Unterschiede waren als statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$) einzustufen. Sowohl in konventionell hergestelltem Plasma als auch im ACP konnten erwartungsgemäß die EZ fast vollständig eliminiert werden. Wie in Abb. 4 zu sehen ist, war die TZ-Konzentration im ACP am höchsten ($p < 0,01$) und in konventionell hergestelltem Plasma am niedrigsten ($p < 0,01$) anzutreffen, verglichen mit den im Vollblut gemessenen Werten. Hierbei konnte im ACP lediglich eine maximal zweifache Konzentrierung der TZ gegenüber Vollblut nachgewiesen werden (Abb. 4, Tab.3). Die Erhöhung der TZ- Werte im ACP im Vergleich zu konventionellem Plasma war hoch signifikant ($p < 0,01$). Darüber hinaus war auch der Unterschied zu den im Vollblut gemessenen TZ-Werten als hoch signifikant ($p < 0,01$) einzustufen.

Die Messwerte der GF sind in Tab. 4 und Abb. 5 dargestellt. Die Konzentration von TGF- β_1 konnte mit einer 3,4-fachen ($p < 0,01$), und die Konzentration von PDGF-BB mit einer 4,4-fachen ($p < 0,01$) Erhöhung im ACP verglichen mit konventionellem Plasma nachgewiesen werden. Auch wie bei der ersten Teilstudie gab es eine hohe Variabilität bezüglich der ermittelten Konzentrationen der beiden GF bei den Tieren.

Diskussion

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Studie, die zum Ziel hatte, optimale Parameter zur Herstellung von Autologous Conditioned Plasma® beim Pferd zu ermitteln. Zudem sollte ein Nachweis der Erhöhung der GF im ACP unter optimalen Aufbereitungsbedingungen erfolgen. Grundsätzlich wird hier das Prinzip der Röhrenmethode zur Aufbereitung des TZK herangezogen (Andrade et al. 2008). Schon Anitua (1999) formulierte ein nach dem Prinzip der Zentrifugationsmethode funktionierendes PRP-Aufbereitungsverfahren für den Menschen (450 xg für 8 min). Für ACP wird in der Humanmedizin vom Hersteller eine Zentrifugationsvariante von 1500 U/min über 5 Minuten empfohlen (352 xg/5 min). Die Parameter der ACP-Aufbereitung für das Pferd konnten jedoch noch nicht genau definiert werden. Argüelles et al. (2006) geben im Rahmen ihrer Studie für die erste Zentrifugation 120 xg/5 min und für die zweite Zentrifugation

Tab. 3 TZ-Konzentration und Hämatokritwert (HK); Vergleich Vollblut, ACP, konventionelles Plasma (n=10)

| Vollblut | | ACP | | konventionelles Plasma | |
|----------|----------|----------|----------|------------------------|----------|
| TZ (G/L) | HK (L/L) | TZ (G/L) | HK (L/L) | TZ (G/L) | HK (L/L) |
| 120,9 | 0,29 | 206,4 | 0 | 17,9 | 0 |

TZ, Thrombozyten; HK, Hämatokrit

Tab. 4 GF-Konzentrationen; Vergleich ACP, konventionelles Plasma (n=10)

| ACP | | konventionelles Plasma | |
|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| TGF- β_1 (ng/ml) | PDGF-BB (ng/ml) | TGF- β_1 (ng/ml) | PDGF-BB (ng/ml) |
| 1,74 ($\pm 0,8$) | 1,02 ($\pm 0,4$) | 0,50 ($\pm 0,4$) | 0,23 ($\pm 0,2$) |

240 xg/ 5 min als Aufbereitungsparameter für das Pferd vor, um PRP zu erzeugen. Daran orientiert wurde für die vorliegende Studie die RCF bei 127 xg (900 U/min), 189 xg (1100 U/min), 265 xg (1300 U/min) und 352 xg (1500 U/min) mit verschiedenen Zeiten (4, 5 und 6 min) gewählt, um die TZ zu konzentrieren. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die TZ-Konzentration mit steigender RCF abnimmt, und sich eine zu starke Zentrifugation negativ auf das TZK auswirkt. Einerseits werden die TZ aus dem Plasma eliminiert, indem sie abzentrifugiert werden, andererseits können sie durch zu starke Erschütterungen (Scherkräfte) möglicherweise zu früh aktiviert werden und setzen dadurch ihre GF vorzeitig frei (Dohan Ehrenfest et al. 2009). Beim Doppelzentrifugationsverfahren kann durch zu hohe Zentrifugalbeschleunigung eine Aktivierung der TZ bewirkt werden. Zudem zeigen TZ nach verstärkter mechanischer Einwirkung eine stärkere Neigung zu agglutinieren (Sutter et al. 2004). Bei vorzeitiger Aktivierung der TZ könnten die GF nicht nur im PRP vorhanden sein, sondern im überstehendem Plasma (PPP) verloren gehen (Dohan Ehrenfest et al. 2009). Im Gegensatz dazu wird beim ACP das gesamte Plasmavolumen appliziert und bereits freigesetzte GF gehen nicht verloren. Beim Vergleich der TZ-Konzentrationen zwischen Vollblut, konventionellem Plasma und ACP waren in der aktuellen Studie die höchsten TZ-Konzentrationen im ACP nachzuweisen ($p < 0,01$). Den Anstieg von TZ im ACP im Vergleich zu konventionellem Plasma konnten auch Stief et al. (2011) in ihrer Studie über die ACP-Aufbereitung beim Hund nachweisen. Die Ergebnisse der aktuellen Studie zeigen, dass bei der geringsten Umdrehungszahl und der kürzesten Zeit (hier als schonende Zentrifugation bezeichnet (900 U/min x 4 min)), die höchsten TZ-Werte ermittelt werden konnten, was einer Mittelwertkonzentrierung auf 160 % entspricht. Demnach hat nicht nur die Geschwindigkeit der Zentrifugation, sondern auch die Dauer einen wesentlichen Einfluss auf die TZ-Konzentration, da bei gleicher RCF und längerer Zentrifugation ebenfalls ein Abfall der TZ nachgewiesen wurde. Generell ist der Abfall der TZ- und LZ-Werte pro Kombination, dass heißt, mit steigender RCF und Zeit, nur als geringgradig anzusehen. Die unterschiedlichen Aufbereitungsparameter wurden absichtlich mit geringgradigen Abstufungen gewählt, um präzise Ergebnisse zu erhalten. In Folge dessen ergaben sich auch keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich TZ- und LZ-Konzentrationen zwischen den Kombinationen in absteigender Reihenfolge. Wenn jedoch die schonendste (900 U/min x 4 min) und die stärkste (1500 U/min x 6 min) Zentrifugation verglichen werden, ergeben sich signifikante Unterschiede in der TZ-Konzentration ($p = 0,014$). Argüelles et al. (2006) beschrieben eine maximale Erhöhung der TZ-Konzentration auf 172 % (272 G/L) durch Doppelzentrifugation, die im Vergleich zur vorliegenden Studie mit einer Erhöhung auf 160 % (238 G/L) der TZ-Konzentration mittels einfacher Zentrifugation nahezu auch erzielt werden konnte. Argüelles et al. (2006) erhielten durch ihre Versuche auch ähnliche Werte mittels Einzelzentrifugation (144 % Erhöhung der TZ-Konzentration, 229 G/L), jedoch lagen die LZ-Werte etwas höher (58 % bei Einzelzentrifugation und 118 % bei Doppelzentrifugation bezogen auf Vollblut). Vor allem bei der Doppelzentrifugation ließen sich vermutlich durch die nochmalige Zentrifugation des Plasmas erhöhte LZ-Konzentrationen nachweisen. Andere Studien beschrieben TZ-Konzentrationen beim Pferd von 490 G/L (Carter et al. 2003) oder sogar 855 G/L (518 % Erhöhung) (Sutter et al. 2004) mittels Doppelzentrifugation und Röh-

chenmethode. Marlovits et al. (2004) beschrieben eine 300%ige Konzentration von TZ mittels Plasmaphereseverfahren. Beachtenswert erscheint dabei, dass in diesen PRP-Präparaten auch sehr hohe LZ-Werte auftraten (32-33 G/L). Die LZ-Werte im ACP fielen verglichen mit anderen TZK sehr gering aus, vor allem verglichen mit der Plasmapherese- oder Buffy Coat Methode (Weibrich et al. 2005). ACP wurde konzipiert, um die TZ bei gleichzeitiger Elimination der LZ und EZ zu konzentrieren. Bei den Werten die sich aus der vorliegenden Studie ergeben, lagen die höchsten ausfallenden LZ-Konzentrationen bei 2,3 G/L (36 % bezogen auf Vollblut). Auch Stief et al. (2011) konnten in ihrer Studie über die ACP-Aufbereitung beim Hund niedrige LZ-Konzentrationen erzielen, und weisen auf die negativen Effekte von LZ in Gelenken hin. Die Rolle der LZ in TZK beim Pferd ist noch nicht ausreichend erforscht (Argüelles et al. 2006). LZ erfüllen im Rahmen der Wundheilung wichtige Funktionen, indem sie z.B. Bakterien eliminieren. In den meisten PRP-Produkten sind – wie oben schon angeführt – LZ in hohen Konzentrationen vorhanden. Schnabel et al. (2007) beschrieben das Vorhandensein von LZ als mögliches Problem bei der Geweberegeneration. In den LZ sind pro-inflammatorische Mediatoren und Enzyme – wie Zytokine, O_2 -Radikale, Matrix Metalloproteinasen (MMP's) und Säurehydrolasen – vorhanden (Schnabel et al. 2007). Diese wirken gewebschädigend und zerstören die Zellen ihrer Umgebung (Everts et al. 2006). Bei intraartikulär injiziertem TZK mit hohem LZ-Anteil konnten sowohl Gelenksfüllungen als auch Gelenkentzündungen einige Tage nach Injektion aufgezeichnet werden (Carmona et al. 2005). Deshalb liegt der Gedanke nahe, dass LZ in manchen Geweben Entzündungen nach deren Applikation hervorrufen können (Argüelles et al. 2006). ACP stellt somit eines der wenigen TZK-Produkte dar, das LZ effektiv reduziert.

Unter Berücksichtigung aller gemessenen Parameter stellte sich die Kombination 1100 U/min x 5 min als die günstigste Variante heraus. Hierbei zeigte sich eine deutliche Erhöhung der TZ-Konzentration (149 %), die mit einer sehr geringen LZ-Beimengung (12 %) einher ging. Laut Marx et al. (2000) wird eine mindestens 4-mal höhere TZ-Konzentration in TZK verglichen mit der im Vollblut vorgegeben, um ein TZK als PRP bezeichnen zu dürfen. Die doch deutlich geringere Konzentrierung der TZ im ACP verglichen mit anderen PRP-Produkten lässt sich unter anderem über den Volumenunterschied erklären. Bei konventionellen Doppelzentrifugationsherstellungssystemen wird nur ein Teil des Plasmas (PRP) eingesetzt. Daraus ergibt sich ein Plasmavolumen von 10-20 %. Beim ACP soll, wenn möglich, das komplette Plasmavolumen (ohne Buffy Coat) reinjiziert werden. Die Menge an entstandenem ACP liegt normalerweise bei 5-6 ml (je nach Hämatokritwert des Pferdes). Somit steht dem Patienten fast das gesamte Volumen an Plasma und somit auch alle im Plasma vorhandenen TZ und GF zur Verfügung. Dies könnte bei klinischer Anwendung für den Patienten einen Vorteil darstellen. Deswegen ergibt sich daraus eine geringere Konzentration an TZ im ACP als im PRP, dafür aber eine hohe absolute TZ-Zahl. Ein daraus resultierender Nachteil könnte sich bei kleinen Defekten, in die nur ein kleines Volumen appliziert werden kann, ergeben.

Beim ACP wird – auf Grund der oben genannten Risiken – die LZ-Konzentration so gut wie möglich minimiert. Zudem sollte auch die EZ-Zahl gering gehalten werden. Auch den EZ werden in Gelenken entzündungsinizierende Eigenschaften

nachgesagt (Stief et al. 2011). Darum muss darauf geachtet werden, dass der Buffy Coat und die EZ nicht in das TZK mit aufgezogen werden. Auf Grund des doch relativ großen Durchmessers der großen äußeren Spritze im Verhältnis zum Volumen wird der Buffy Coat auf eine große Fläche verteilt und stellt somit nur eine sehr dünne Schicht dar. Der Buffy Coat und die EZ können somit auch problemlos in der Spritze belassen werden, ohne viel Plasma und vor allem TZ zu verlieren. Die Ergebnisse haben gezeigt dass im ACP auch die EZ fast vollständig eliminiert werden konnten. Aus diesem Grunde kann bei ACP-Therapien mit einem Plasmaprodukt fast ohne EZ mit sehr niedrigen LZ-Konzentrationen gearbeitet werden. Ausgehend von unseren Ergebnissen ist anzunehmen, dass bei zu starker Zentrifugation ein Teil der TZ nahe oder gar im Buffy Coat zu liegen kommt und daher manchmal dort verbleibt und demzufolge verloren geht.

Für die GF-Messungen wurden zunächst mehrere ELISA-Kits mit verschiedenen GF (PDGF-BB, PDGF-AA, IGF, TGF- β_1 , TGF- β_2 , EGF, VEGF) auf ihre Anwendbarkeit beim Pferd getestet. Ob ein für humanes Plasma etablierter ELISA-Kit für das Pferd generell anwendbar ist, steht in Frage. Im Ergebnis dieser Voruntersuchungen kamen nur zwei verschiedene GF, TGF- β_1 und PDGF-BB, in Frage, da die Werte der anderen GF unterhalb des Messbereiches lagen. TGF- β_1 und PDGF-BB weisen 99% Homologie zwischen Mensch und Pferd auf (Penha-Goncalves et al. 1997) und wurden zuvor schon in einigen Studien am Pferd herangezogen (Carter et al. 2003, Sutter et al. 2004). Die Ergebnisse der GF-Messungen ergaben bei der ersten Zentrifugation (900 U/min x 4min) die höchsten Konzentrationen an GF (sie lagen im Mittel bei 1,70 ($\pm 0,08$) ng/ml für TGF- β_1 und bei 1,88 ($\pm 0,07$) ng/ml für PDGF-BB), doch auch die höchste LZ-Konzentration. Bei 1100 U/min x 5 min wurden für TGF- β_1 1,40 ng/ml ($\pm 0,08$) und für PDGF-BB 1,58 ng/ml ($\pm 0,07$) gemessen. Bei der Zentrifugation mit 1300 U/min x 6 min lagen die GF-Werte deutlich darunter. Argüelles et al. (2006) wiesen für TGF- β_1 bei Ihren Messungen beim Pferd (Einzelzentrifugation) 9,4 ng/ml im PRP nach. Bosch et al. (2010) beschrieben in Ihrer Studie eine 2,9-fache Erhöhung des PDGF-BB und eine 4,5-fache Erhöhung des TGF- β_1 in ihrem PRP verglichen mit den Blutsrumwerten. Die vorliegenden Ergebnisse ergaben ähnliche Konzentrationen für 1100 U/min x 5 min: TGF- β_1 3,4-fach (1,02 ng/ml) höhere Konzentration und für PDGF-BB 4,5-fach (1,72 ng/ml) höhere Konzentration im ACP als im Plasma. Andere Studien wiesen höherer GF-Werte nach, jedoch bei deutlich höherer LZ-Konzentration und anderer Methodik der Probenaufbereitung (Sutter et al. (2004): 15,3 ng/ml, Carter et al. (2003): 7,4 ng/ml). Die wesentlich höhere GF-Konzentration anderer Studien könnte über das Faktum erklärt werden, dass unsere Zentrifugationen schonender als die anderer Autoren durchgeführt wurden. Mittels kurzer Auslaufzeit und niedriger RCF wird wie im Fall vom ACP verhindert, dass die TZ eine vorzeitige Aktivierung erfahren, und dabei die GF ins Plasma freisetzen (Dohan Ehrenfest et al. 2009). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die im ACP vorhandenen TZ durch die schonende Aufbereitung nur zum Teil ihre GF vor Applikation ausschütten und ein großer Anteil noch intrazellulär bestehen bleibt. LZ enthalten – wie auch TZ – diverse GF, die sie freisetzen können (Anitua et al. 2004). Die höhere Konzentration der LZ in anderen TZK könnte somit eine weitere Erklärung für die höheren GF-Konzentrationen sein. Des Weiteren muss die absichtliche TZ-

Aktivierung betrachtet werden, die ebenso für diese Konzentrationsunterschiede verantwortlich sein kann. Das am häufigsten für die Plättchenaktivierung angewandte Protein ist Thrombin. Es besteht aber auch die Möglichkeit, Calciumchlorid als TZ-Aktivator dem Plasma zuzusetzen (Anitua 1999, Weibrich et al. 2002).

In der Studie von Appel et al. (2002) wurde eine hohe Korrelation zwischen TZ- und GF- (PDGF-AB und TGF- β_1) Konzentrationen festgestellt. Diese konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Die in der Studie einbezogenen Pferde zeigten sehr unterschiedliche, interindividuelle GF-Konzentrationen auf (PDGF-BB: 0,82-2,66 ng/ml; TGF- β_1 : 0,72-3,31 ng/ml), die nur sehr begrenzt mit der TZ-Konzentration korrelierten. Auch die Ergebnisse der TGF- β_1 Messungen von Argüelles et al. (2006) zeigen extrem hohe Schwankungen (1,5-174,8 ng/ml). Möglicherweise könnten solche Unterschiede durch etwa gleich alte Tiere und eine höhere Anzahl an Probanden reduziert werden. Dabei sind auch Streuungen durch die verwendete Messmethode (ELISA) zu berücksichtigen.

Der Zeitbedarf der Herstellung von ACP betrug von der Blutabnahme bis zum fertigen Injektionsgut etwa 10 Minuten. Die Aufbereitung erwies sich selbst für unerfahrene Untersucher als einfach durchführbar und gut verständlich. Es ist somit eines der schnellsten Verfahren zur Herstellung eines TZK. Argüelles et al. (2006) wiesen ähnlich kurze Aufbereitungszeiten bei Einzelzentrifugationsmethode nach (10-12 min). Appel et al. (2002) beschrieben drei verschiedene Verfahren zur PRP-Erzeugung, wobei die Zeit der Herstellung, zwischen 35 Minuten und 2 Stunden variierte.

Das ACP®-Doppelspritzensystem erlaubt eine sterile Aufbereitung, das gerade bei der Röhrchenmethode nicht immer leicht ausführbar ist. Argüelles et al. (2006) sehen die Verwendung einer teuren laminären Durchflussskammer bei der Röhrchenmethode mittels Doppelzentrifugation für unbedingt notwendig an, um einer bakteriellen Kontamination vorzubeugen. Bei der durch Anitua (1999) beschriebenen Technik der PRP-Aufbereitung ergeben sich einige „Lücken“, die zu bakterieller Kontamination führen können. Da bei der ACP-Herstellung nur eine Zentrifugation nötig ist, kann ein Schutz vor Verunreinigung gewährleistet werden, da kein Umfüllvorgang erforderlich ist. Da die Spritzen zudem ineinander liegen, kann das Plasma ohne Luftkontakt abgezogen werden. Die vorgesehenen Zentrifugeneinsätze sind ebenso steril verpackt und bei korrekter Handhabung (mit Verwendung steriler Handschuhe) bleibt die Spritze bis zur Injektion steril. Durch diese schnelle und sterile Technik sind auch intraoperative Behandlungen leicht und gut durchführbar. Der Materialaufwand erscheint wie in der PRP-Herstellungsmethode von Argüelles et al. (2006) gering. Im Gegensatz dazu wird die Technik von Anitua (1999) mit weitaus höherem Materialaufwand angesehen. Marx (2004) beschrieb die „optimale TZK-Aufbereitung“ als einfach auszuführende Methode, bei der TZ in hohem Maße simpel isoliert werden können, ohne vorzeitig aktiviert zu werden. ACP hat fast alle angestrebten Parameter (höherer TZ, niedrigere LZ) erreicht, jedoch ist die TZ-Konzentration niedriger verglichen mit anderen Methoden. Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass ACP ein schnell anwendbares und zeitsparendes TZK-Produkt ist, welches sich beim Pferd gut anwenden lässt.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist eine Kombination von 1100 U/min x 5 min beim Pferd zur Behandlung verschiedener Indikationen zu empfehlen. Dabei wird durch die geringe RCF die Gefahr einer vorzeitigen Aktivierung vermindert. Bei dieser Variante konnte eine relative hohe Konzentrierung der TZ (149 %) bei gleichzeitig sehr niedriger LZ-Konzentration (12 %) im Vergleich mit Vollblut erzielt werden.

Erklärung zum Ausschluss von Interessenskonflikten

Die Autoren bestätigen, hinsichtlich der in diesem Beitrag untersuchten oder erwähnten Medikamente oder medizinisch-technischen Geräte keinerlei Interessenskonflikten zu unterliegen.

Literatur

- Andrade M.G., de Freitas Brandão C. J., Sá C. N., de Bittencourt T. C. und Sadigursky M. (2008) Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 105, 5-12
- Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nurden P. und Nurden A. T. (2004) Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 91, 4-15
- Anitua E. (1999) Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 14, 529-535
- Appel T. R., Pötsch B., Müller J., von Lindern J. J., Bergé S. J. und Reich R. H. (2002) Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin. Oral Implants. Res.* 13, 522-528
- Argüelles D., Carmona J. U., Pastor J., Iborra A., L. Vinals L., Martinez P., Bach E. und Prades M. (2006) Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res. Vet. Sci.* 81, 237-245
- Argüelles D., Carmona J. U., Climen F., Muñoz E. und Prades M. (2008) Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Vet. Rec.* 162, 208-211
- Buhr M. und Siekmann W. (2009) Intraarticular injection of platelet rich plasma for cartilage repair. *Orthopädische Praxis.* 45, 10-16
- Carter C. A., Jolly D. G., Worden C. E. Sr, Hendren D. G. und Kane C. J. (2003) Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp. Mol. Pathol.* 74, 244-255
- Castillo T. N., Pouliot M. A., Kim H. J. und Dragoo J. L. (2011) Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am. J. Sports. Med.* 39, 266-271
- Clemmons R. M., Bliss E. L., Dorsey-Lee M. R., Seachord C. L. und Meyers K. M. (1983) Platelet function, size and yield in whole blood and in platelet-rich plasma prepared using differing centrifugation force and time in domestic and food-producing animals. *Thromb. Haemost.* 50, 838-843
- Dohan Ehrenfest D. M., Rasmusson L. und Albrektsson T. (2009) Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 27, 158-167.
- Eppley B.-L., Woodell J. E. und Joel Higgins J. (2004) Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 114, 1502-1508
- Haber M., Cao Z., Panjwani N., Bedenice D., Li W. W. und Provost P. J. (2003) Effects of growth factors (EGF, PDGF-BB and TGF- β_1) on cultured equine epithelial cells and keratocytes: implications for wound healing. *Vet. Ophthalmol.* 6, 211-217
- Hall M. P., Band P. A., Meislin R. J., Jazrawi L. M. und Cardone D. A. (2009) Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 602-608
- Kon E., Buda R., Filardo G., Di Martino A., Timoncini A., Cenacchi A., Fornasari P. M., Giannini S. und Marcacci M. (2009) Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg. Sports. Traumatol. Arthrosc.* 18, 472-479
- Marlovits S., Mousavi M., Gabler C., Erdos J., Vecsei V. (2004) A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note *Eur. Spine J.* 13 (Suppl. 1), 102-S106
- Marx R. E. (2001) Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant. Dent.* 10, 225-228
- de Mos M., van der Windt A. E., Jahr H., van Schie H. T., Weinans H., Verhaar J. A. und van Osch G. J. (2008) Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am. J. Sports. Med.* 36, 1171-1178.
- Perotta P. L. und Snyder E. L. (2007) Platelet storage and transfusion. Platelets. Michelson A, editor. 2 ed., Academic Press; 2007. p. 1265-1295
- Sanchez M., Anitua E., Orive G., Mujika I. und Andia I. (2009) Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med* 39, 345-354
- Schnabel L. V., Mohammed H. O., Miller B. J., McDermott W. G., Jacobson M. S., Santangelo K. S. und Fortier L. A. (2007) Platelet Rich Plasma (PRP) Enhances Anabolic Gene Expression Patterns in Flexor Digitorum Superficialis Tendons. *J. Orthop. Res.* 25, 230-40
- Schrör K. (2001) Pathophysiology of platelet activation and pharmacology of GPIIb/IIIa inhibitors. *Herz.* 26, Suppl. 30-35.
- Stief M., Gottschalk J., Ionita J. C., Einspanier A., Oechtering G. und Böttcher P. (2011) Concentration of platelets and growth factors in canine autologous conditioned plasma. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 24, 122-125
- Sutter W. W., Kaneps A. J. und Bertone A. L. (2004) Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *Am. J. Vet. Res.*, 65, 924-930
- Weibrich G., Buch R. S., Kleis W. K., Hafner G., Hitzler W. E. und Wagner W. (2002) Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth Factors.* 20, 93-97
- Weinberger T. (2008) Regenerative Therapiemöglichkeiten beim Pferd- eine Übersicht. *Pferdespiegel* 3, 1-4
- van Wie B. J. und Hustvedt E. L. (1988) Particle interaction effects on blood cell sedimentation and separations. *Biorheology.* 25, 651-662.

Christina Kissich
Chirurgische Tierklinik
Universität Leipzig
An den Tierkliniken 21
04103 Leipzig
kissich@vetmed.uni-leipzig.de