

Comparison of cellular and growth factor concentrations in equine Autologous Conditioned Plasma® (ACP) and manually prepared Platelet Rich Plasma (mPRP)

Jean-Claude Ionita¹, Christina Kissich¹, Jutta Gottschalk², Almuth Einspanier², Gabor Köller³, Karsten Winter⁴ and Walter Brehm¹

¹ Large Animal Clinic for Surgery, University of Leipzig, Germany

² Institute of Veterinary Physiological Chemistry, University of Leipzig, Germany

³ Large Animal Clinic for Internal Medicine, University of Leipzig, Germany

⁴ Translation Center for Regenerative Medicine, University of Leipzig, Germany

Summary: Autologous Conditioned Plasma® (ACP) is commonly used to treat orthopedic disorders in horses and is characterized by a moderate supra-physiological platelet concentration, which might however be too low to achieve optimal tissue regenerative effect. Because of considerably lower costs and potentially higher platelet concentrations, non-commercial, manual, double-centrifugation tube methods (mPRP) are often employed instead. However, mPRP preparation is tedious and not standardized. In order to determine if an “in-house” mPRP technique can be a valuable alternative to ACP in the practice, the aim of this study was to compare the manual product to the commercial method with respect to their preparation process, platelet activation level (assessed by measuring the mean platelet volume (MPV) and mean platelet component (MPC)), as well as absolute platelet, leukocyte, transforming growth factor-β1 (TGF-β1) and platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) concentrations. For this purpose, all these parameters were determined in ACP, mPRP and its platelet poor plasma (mPPP) obtained from venous blood samples of 10 healthy adult horses. The mean platelet concentration in mPRP reached $221.4 \pm 60.3 \times 10^9/l$ and was 1.2- and 1.4-fold higher than in ACP and mPPP respectively. Mean leukocyte content in mPRP reached $25.8 \pm 10.9 \times 10^9/l$ and was 32.3- and 19.9-fold higher than in ACP and mPPP respectively. Mean PDGF-BB level in mPRP (1.81 ± 0.58 ng/ml) was 1.7-fold higher than both in ACP and mPPP. mPRP showed a 2- and 1.8-fold higher mean TGF-β1 concentration (3.62 ± 1.16 ng/ml) than ACP and mPPP respectively. MPC reached 20.3 ± 1.3 g/l in mPRP, 20.6 ± 1.6 g/l in ACP and 20.4 ± 1.7 g/l in mPPP. MPV was 8.6 ± 0.7 fl in mPRP, 8.7 ± 1.0 fl in ACP and 8.4 ± 0.9 fl in mPPP. ACP preparation was easily performed, whereas mPRP processing was laborious and time-consuming. Compared to ACP, the “in house” mPRP method achieved a slightly higher mean platelet concentration in a much smaller end-volume, though. Mean leukocyte, TGF-β1 and PDGF-BB levels in mPRP were significantly above the values in ACP and mPPP, which both showed similar results. The high mean leukocyte concentration in mPRP could possibly induce unwanted local inflammatory reactions. Platelet activation degree did not differ between the three products. The mPRP processing method described in this study should therefore first be adjusted and optimized before being recommended for extensive use in horses. Compared to other equine platelet concentrates reported in the literature, mPRP and ACP both showed low absolute platelet and GF levels; further comparative clinical studies are needed to determine if these values were sufficient to induce a satisfactory clinical effect.

Keywords: horse / platelets / comparison / PRP / ACP / regenerative medicine

Citation: Ionita J.-C., Kissich C., Gottschalk J., Einspanier A., Köller G., Winter K., Brehm W. (2014) Comparison of cellular and growth factor concentrations in equine autologous conditioned plasma (ACP®) and manually prepared platelet rich plasma (mPRP). *Pferdeheilkunde* 30, 195-201

Correspondence: Dr. Jean-Claude Ionita, Large Animal Clinic for Surgery, University of Leipzig, An den Tierkliniken 21, 04103 Leipzig, Germany, E-Mail: ionita@vetmed.uni-leipzig.de

Introduction

Autologous platelet enriched products (APPs) are widely used by equine practitioners for the treatment of tendinous injuries in horses (Argüelles et al. 2008, Waselau et al. 2008, Bosch et al. 2010, Rindermann et al. 2010, Castelijns et al. 2011, Geburek and Stadler 2011). These hemoderivative products sequester and concentrate platelets in a small plasma volume (or other base solution) for intralesional or topical application (Gonshor 2002, Anitua et al. 2003, Marx 2004, Argüelles et al. 2006, Textor 2011). As a regenerative medical therapy, it is presumably based on the effects of the growth factors (GFs) and other molecules contained in the alpha granules of the platelets, in leukocytes and in the plasma. Platelet, GF and leukocyte concentrations are therefore thought to be the main biological qualitative parameters influencing the clinical effect of APPs (DeLong et al. 2012). It has been proposed that human APPs have to contain at least 200×10^9 platelets/l in order to be defined as “platelet rich plasma” (PRP) (Boswell et

al. 2012). Other authors suggested that the platelet concentration in APPs should range between $300 \times 10^9/l$ and $1'500 \times 10^9/l$ to achieve the best therapeutic effectiveness (Anitua et al. 2003, Giusti et al. 2009, Textor 2011). However, in equine medicine, there is still a lack of real definition and APPs are often, although sometimes misleadingly, grouped under the generic term “PRP”.

Upon platelet degranulation, GFs, such as platelet derived growth factor BB (PDGF-BB) and transforming growth factor β1 (TGF-β1), are released in relatively high concentrations (Eppley et al. 2004, Pietrzak and Eppley 2005, Eppley et al. 2006, Textor and Tablin 2012) to promote and orchestrate the complex wound healing process (Anitua et al. 2003, Carter et al. 2003, Theoret 2004, Anitua et al. 2008). There are several techniques to evaluate the degree of platelet activation. One simple method uses an automated flow cytometry haematological analyser (ADVIA 120, Siemens, Germany) to

measure the volume and refractive index of platelets on a cell-by-cell basis to respectively provide values for the mean platelet volume (MPV) and mean platelet component (MPC). The MPV represents the size of the platelet and increases as platelets become activated to change their form from quiescent discs to swollen spheres. The MPC is linearly related to platelet density and decreases after activation with subsequent degranulation and molecule release. Both parameters have been used as reliable indicators of platelet activation (Segura et al. 2007, Beard et al. 2011).

Autologous Conditioned Plasma® (ACP) is a plasma-based blood product, which is frequently applied in equine orthopedics, as it is quickly and easily processed after one relatively soft and short centrifugation step using a patented double syringe system. This product is characterized by a moderate supra-physiological platelet concentration and low leukocyte level, as demonstrated in one study, which validated the ACP preparation process in horses. It showed that ACP reached a mean platelet absolute concentration of $219 \times 10^9/l$ and a quite constant mean platelet enrichment factor of 149% ($\pm 20\%$) compared to baseline blood levels (Kissich et al. 2012). Thus, platelet concentration was substantially inferior to the values reported for other APPs in horses (Waselau et al. 2008, Bosch et al. 2010, Castelijns et al. 2011) and may not be sufficient to achieve optimal tissue regenerative effect.

Because of considerably inferior costs and a potentially higher platelet concentration, many equine practitioners prefer the use of non-commercial, double-centrifugation (first soft and second hard), manual, tube methods to produce PRP (referred to hereafter as mPRP). Argüelles et al. (2006) published a description of a technique to produce mPRP in horses, but other methodologies have been reported since (Toricelli et al. 2011, Maciel et al. 2012), so that, in contrast to ACP and other commercial kits, there is a lack of a standardized preparation procedure. Inappropriate processing techniques may account for unsatisfactory cellular concentrations and therefore poor bioactivity of mPRP in horses. Moreover, its production is laborious, time-consuming and requires some skills, which may be disadvantageous for routine application. Also, as platelets are very prone to activation, their morphology and function may be affected during mPRP processing, leading to early degranulation and loss of GFs in the supernatant platelet poor plasma (mPPP), which is discarded (Textor 2011).

In order to determine if an "in-house" mPRP technique can be a valuable alternative to ACP in equine practice, the aim of this study was to compare the manual product to the commercial method with respect to the practicability of their preparation process, as well as their absolute platelet, leukocyte, TGF- β 1 and PDGF-BB concentrations, which can influence their clinical effect. Moreover their MPV and MPC were also measured to determine if mPRP processing induces premature platelet activation.

Materials and Methods

This study was conducted in accordance with the German regulations on animal welfare. Prior approval was granted by the local legal authorities of Saxony (i.e. animal protection authorities in Leipzig, V10/11).

Ten healthy adult warm blood horses (3 mares, 5 geldings and 2 stallions, aged 12 ± 6 years) were included in this study. Clinical and hematological examinations excluded the presence of any systemic disease. Horses were housed in boxes, received hay and water ad libitum, and were kept free of medication for two weeks prior to, and for the duration of this study.

Blood collection

After clipping and disinfection of the left jugular groove of the horses, a 14 G polyethylene venous catheter (Braunüle Vasocan®: B. Braun AG, Melsungen, Germany) was inserted upwards into the jugular vein. Hematological analyses (including MPV/MPC measurement) were completed using a flow cytometric hematology cell analyzer (ADVIA® 120: Siemens AG, München, Germany). All hemograms were performed in duplicate.

ACP processing

Autologous Conditioned Plasma® (ACP®: Arthrex GmbH, München, Germany) was prepared as described by Kissich et al. (2012): in brief, 1 ml of ACD-A (noClot-400™: Cytosol Laboratories, Braintree, USA) was drawn in the large external syringe and 9 ml of blood were gently collected and agitated. The samples were then immediately centrifuged at 1100 U/min (189 g) for 5 min, using the centrifuge (Rotofix 32A®: Rotor 1324, Andreas Hettich, GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany) and buckets (SK 18.06-3: Andreas Hettich, GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany) provided by the manufacturer. 5.5 ml of supernatant plasma was then drawn into the inner smaller 6 ml syringe. The time elapsed between blood aspiration and the end of the product preparation was recorded. After that, the ACP samples were aliquoted into three cryopreservation tubes (Cryo tubes 2.0 ml: Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland). One was directly used for hematological analysis; the second and third were frozen at -80°C until their PDGF-BB and TGF- β 1 concentrations were measured.

mPRP preparation

mPRP was prepared using an "in-house" double centrifugation tube method, with which the authors of the present study treated horses in the past (data not published). Immediately after ACP preparation, 2×9 ml of blood were collected from each horse in two tubes (10 ml S-Monovette™: Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) containing 1 ml of sodium-citrate, gently agitated and centrifuged at 900 U/min \times 5 min (≈ 127 g) using the same centrifuge as above, but other buckets (1390: Andreas Hettich, GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany). After the first centrifugation, supernatant plasma was subjectively divided in two equal parts: an upper (poor in platelets) and a lower (rich in platelets) fraction. The upper fraction was gently collected by using a 5 ml syringe and a 7 cm long 22G needle from "up to down" and discarded. The lower plasma fraction and the buffy coat were slowly drawn from both tubes by using the same materials, and transferred into an empty polypropylene tube (12 ml centrifugation tube: Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland), before

being centrifuged again at 1200 U/min \times 5 min (Δ 225 g). The obtained plasma was again subjectively divided in two different fractions: the upper 75 % of the plasma volume was defined as the platelet poor plasma (mPPP) and gently withdrawn as described above; the lowest part, that contained a small cell pellet, was defined as the platelet rich plasma (mPRP). Cells in the mPRP were first re-suspended using a vortex (Lab Dancer Vario®, IKA Werke GmbH & Co., Staufen, Germany) and withdrawn in a separate syringe. The time elapsed from blood aspiration until the end of the product preparation was recorded. Each mPRP and mPPP sample was aliquoted in three equal parts in freezing tubes (Cryo tubes 2.0 ml: Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland). One was used for a blood cell count and the other two were frozen at -80°C until their GF concentrations were measured.

Measurement of growth factor concentration

The concentration of PDGF-BB and TGF- β 1 in ACP, mPRP and mPPP was measured using human specific, colorimetric „sandwich“ ELISA kits (ELISA, Quantikine Human TGF- β 1 and Quantikine PDGF-BB: R&D Systems, Minneapolis, USA), according to the manufacturer's instructions and after internal validation as explained in the study by Kissich et al. (2012). Plasma samples were kept for 2 months at -80°C before analysis. All ELISA analyses were performed in duplicate.

Statistical Analysis

The software SPSS® 20 for Windows® (IBM, Germany) was used for all statistical analyses. All data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test. Significant differences were tested using one-way ANOVA followed by paired t-tests. Pearson's correlation between the cell and GF concentrations was used for bivariate correlation analyses. The minimum level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

ACP was prepared in approximately 10 min, whereas mPRP processing was more time-consuming (35 min). The final volume of ACP obtained for each patient varied between 6 to 7 ml, but only 5.5 ml could be withdrawn in the inner syringe without co-aspiration of erythrocytes. The final mPRP volume reached approximately 1.5 ml and 4.5 ml for mPPP.

One horse showed abnormal high values that were attributable to processing inaccuracies during the mPRP preparation and was therefore excluded from the study, amounting to $n = 9$ for all parameters. In addition, the MPC and MPV values from ACP were missing from one other horse, leaving $n = 8$ in these cases. Otherwise, repeated cell counts revealed constant results in all three product groups.

Platelet concentration

The highest mean thrombocyte concentration was found in mPRP ($221.4 \pm 60.3 \times 10^9/l$), followed by ACP ($192.4 \pm 31.5 \times 10^9/l$) and mPPP ($163.1 \pm 24.0 \times 10^9/l$)

[Fig.1] with a statistically significant difference between mPRP and mPPP ($p = 0.007$).

Leukocyte concentration

The mean leukocyte concentration was highest in mPRP ($25.8 \pm 10.9 \times 10^9/l$), followed by mPPP ($1.3 \pm 0.6 \times 10^9/l$) and ACP ($0.8 \pm 0.2 \times 10^9/l$) [Fig.2]. High statistically significant differences were found between ACP and mPRP ($p < 0.001$) and between mPPP and mPRP ($p < 0.001$). A significant difference was also found between ACP and mPPP ($p = 0.027$).

PDGF-BB concentration

The mean PDGF-BB concentration was highest in mPRP (1.81 ± 0.58 ng/ml), followed by ACP (1.07 ± 0.28 ng/ml) and mPPP (1.04 ± 0.27 ng/ml) [Fig.3]. Significant differences were observed between ACP and mPRP ($p = 0.001$), as well as between mPPP and mPRP ($p = 0.002$).

TGF- β 1 concentration

The mean TGF- β 1 concentration was highest in mPRP (3.63 ± 1.16 ng/ml), followed by mPPP (2.01 ± 0.54 ng/ml) and ACP (1.80 ± 0.71 ng/ml) [Fig.4]. ACP and mPRP

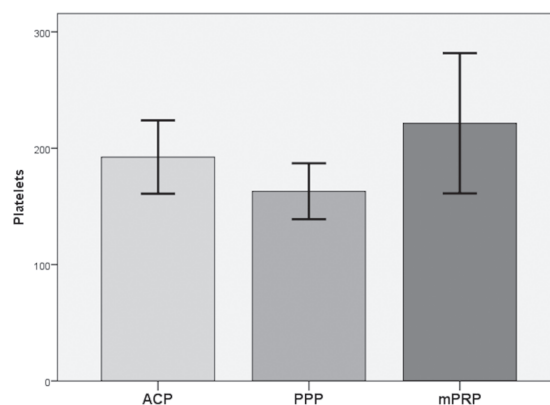


Fig. 1 Mean platelet concentration (10^9 cells/l) in mPRP, mPPP and ACP

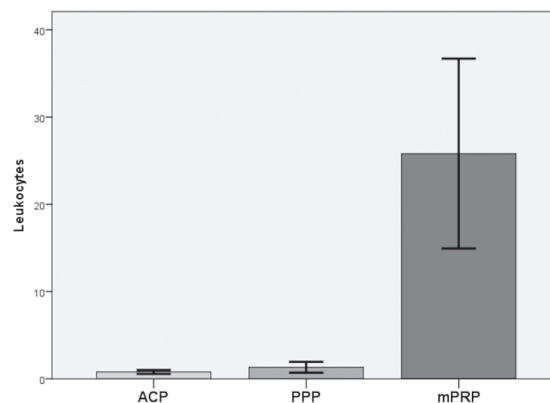


Fig. 2 Mean leukocyte concentration (10^9 cells/l) in mPRP, mPPP and ACP

($p < 0.001$) as well as mPPP and mPRP ($p = 0.001$) differed significantly from each other.

Mean platelet volume (MPV)

The mean MPV values were 8.68 ± 0.97 fl in ACP, 8.37 ± 0.86 fl in mPPP and 8.58 ± 0.67 fl in mPRP [Fig.5]. There were no statistically significant differences between these products.

Mean platelet component (MPC)

The mean MPC values reached 20.61 ± 1.67 g/l in ACP, 20.65 ± 1.59 g/l in mPPP and 20.48 ± 1.27 g/l in mPRP [Fig.6]. No statistically significant differences were detected.

Pearson's correlations

ACP
 PDGF-BB and leukocyte concentrations showed a significant negative correlation ($r = -0.757$, $p = 0.018$).

mPRP
 A highly significant positive correlation between PDGF-BB and platelet concentrations ($r = 0.802$, $p = 0.009$) was found. TGF- β 1 and platelet concentrations were also positively significantly correlated ($r = 0.752$, $p = 0.019$).

mPPP
 There was a positive significant correlation between PDGF-BB and platelet concentrations ($r = 0.687$, $p = 0.041$).

MPV/MPC
 A freeze-thaw cycle induces platelet activation (alteration of MPV and MPC) and GF release. As GFs were measured after cryopreservation and MPV/MPC were not again assessed after thawing the samples these parameters cannot be correlated in this case.

Discussion

Many systems are available on the market to produce APPs, but ACP and the manual, double centrifugation tube technique (mPRP) are two of the most commonly used methods in the equine clinical practice in Europe. In order to find out if the "in-house" mPRP described in this study is a valuable and inexpensive alternative to ACP in the equine practice, i) the practicability of the preparation techniques of both methods was compared and ii) their cellular and GF concentrations, as well as iii) their MPC/MPV were determined, as these factors can strongly influence their bioactivity and clinical effect.

Preparation

The "in-house" mPRP in the present study was prepared according to previous work done by our group (unpublished

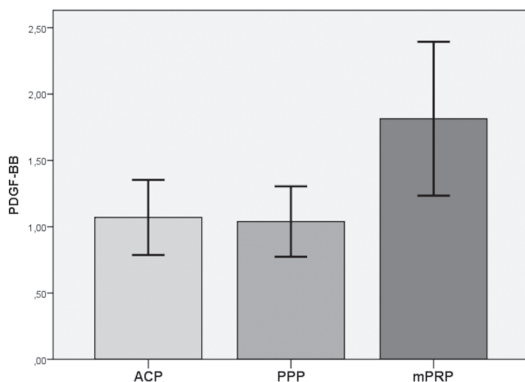


Fig. 3 Mean PDGF-BB concentration (ng/ml) in mPRP, mPPP and ACP

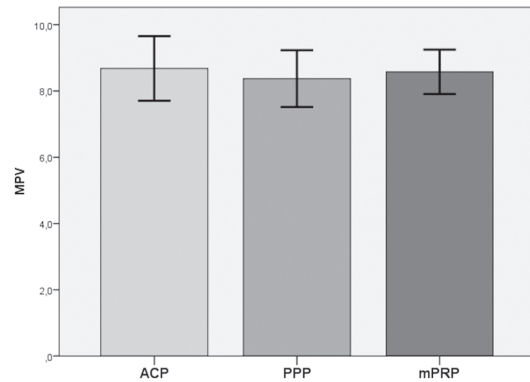


Fig. 5 Mean platelet volume (fl) in mPRP, mPPP and ACP

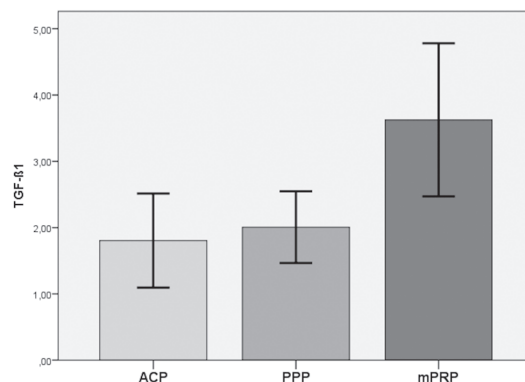


Fig. 4 Mean TGF- β 1 concentration (ng/ml) in mPRP, mPPP and ACP

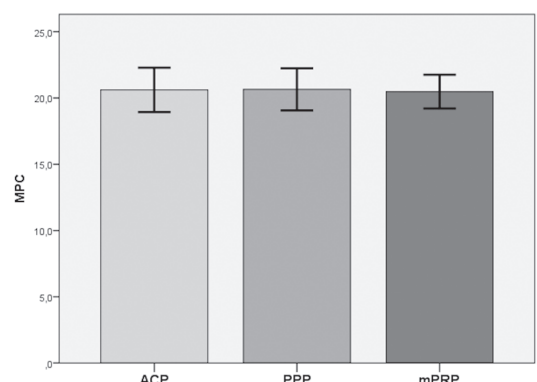


Fig. 6 Mean platelet component (g/l) in mPRP, mPPP and ACP

data), as there is no standard protocol for this method in equine medicine. Relatively soft centrifugations were used compared to other methods (Alvarez et al. 2010, Torricelli et al. 2011, Maciel et al. 2012), to prevent premature platelet activation during the second centrifugation, which might induce loss of GFs in the mPPP (Eppley et al. 2006, Textor 2011). ACP preparation took less than 10 min and was very conveniently accomplished, whereas the processing of mPRP required about 35 min. The use of the rotor brake for rapid deceleration, as done for ACP, induced re-suspension of erythrocytes in the plasma retained in the plastic tubes in the pilot study and was therefore not practicable for mPRP. The end-volume of ACP recovered in the smaller syringe was 5.5 ml, whereas the mPRP end-volume amounted only to 1.5 ml.

Both methods also differed in the respective anticoagulant used during processing. ACP was prepared with ACD-A, whereas the tubes for mPRP preparation were pre-treated with sodium citrate instead. We chose to use sodium citrate tubes because of their competitive price and their widespread use in the equine practice in Germany. It has been demonstrated that ACD-A has a more potent stabilizing effect on platelets than other anticoagulants (Lei et al. 2009). Thus, humoral GF concentrations in ACP may be lower because of this anti-activation effect. Moreover, stronger platelet agglutination is observed when sodium citrate is employed (shown in the pilot study), which deceptively reduces the effective platelet count measured by the blood analyzer and on the other hand probably increases GF release from these cells.

Platelet concentration

The aim of this study was not to determine the effectiveness of platelet sequestration of two techniques in relation to baseline levels, but to compare the absolute cell and GF concentrations of two end-products. More and more attention is paid to the absolute concentrations in an APP and not to the enrichment factors (Textor 2011). The main reason is the high inter-individual variability in cell and cytokine concentrations (Giraldo et al. 2013). Even though one product induces significant platelet enrichment, its absolute concentration may remain under the optimal effective limit, which still has to be determined in horses. For this reason the baseline platelet levels in blood and their enrichment factor in the products were not mentioned here.

Kissich et al. (2012) showed a quite constant mean enrichment factor of $149 \pm 20\%$ for ACP using the same protocol. This low enrichment factor is due to the fact that in contrast to other commercial APPs the entire supernatant plasma volume is used in ACP (Bosch et al. 2010, Castelijns et al. 2011). The end volume of ACP thus depends directly on the hematocrit of the horse. As the packed cell volume normally varies between 30% and 40%, the maximal concentration of thrombocytes obtainable in this system is at best 143%–167% higher than in whole blood.

The mean platelet concentration in mPRP ($221.4 \pm 60.3 \times 10^9/l$) was 1.2 higher than in ACP ($192.4 \pm 31.5 \times 10^9/l$) and 1.4 fold higher than in mPPP ($163.1 \pm 24.0 \times 10^9/l$). All

of these values are clearly inferior to the projected concentration of $1-1.5 \times 10^{10}/l$ to induce an optimal tissue regenerative effect in humans (Giusti et al. 2009, Textor 2011) and may be too low to achieve a clear satisfactory clinical effect in horses. Other studies reported much higher concentrations when using their own mPRP technique (Argüelles et al. 2006, Maia et al. 2009, Torricelli et al. 2011), most likely due to harder second centrifugation steps in their protocol. Reducing the end-volume of plasma in which the platelet pellet is re-suspended (from 25% to 10% of the total plasma volume) after the second centrifugation would increase the final platelet concentration in mPRP (data not shown). Also increasing the relative centrifugation force (RCF) during the second centrifugation would have the same effect by inducing stronger cell sedimentation, as confirmed by the relatively high platelet concentration in mPPP, which was expected to be much lower.

Leukocyte concentration

The need for low or high concentrations of leukocytes in APPs is very controversial and might depend on the medical indication (DeLong et al. 2012). mPRP is a buffy coat based method, whereas ACP is a plasma based product. Accordingly, white blood cell (WBC) concentration was highest in mPRP ($25.8 \pm 10.9 \times 10^9/l$). Omitting the collection of the buffy coat after the first centrifugation would have decreased the leukocyte concentration in mPRP, but this would have also strongly reduced the platelet yield as the buffy coat also contains a large proportion of these cells. The leukocyte count in ACP was comparatively very low ($0.8 \pm 0.2 \times 10^9/l$), as the very thin appearing buffy coat was not drawn. It has been demonstrated that the WBC concentration in ACP was strongly reduced to $11.9\% \pm 3.9\%$ of the initial concentration in whole blood (Kissich et al. 2012).

Some authors aim to avoid leukocytes in APPs as they consider these cells as potentially detrimental for the wound healing process, due to their pro-inflammatory action (Dohan Ehrenfest et al. 2009, Sundman et al. 2011, DeLong et al. 2012). In contrast, studies in which leukocyte-rich APPs were used obtained very satisfactory clinical results (Hall et al. 2009, Lopez-Vidriero et al. 2010, Pedzisz et al. 2010, Dragoo et al. 2012). It is thought that not only the total amount of leukocytes but also the distribution of their subpopulation influences the effect of APPs (DeLong et al. 2012, Yoshida and Murray 2012). Unfortunately no differential hematological analysis was performed here. The influence of leukocytes in platelet concentrates has not yet been elucidated and further research is needed before providing any recommendations.

GF concentrations

APPs in this study were not exogenously activated prior to cryopreservation, as activ is not common in equine clinical practice (Textor 2011). It is assumed that local platelet interaction with collagen after intra-lesional application would induce degranulation. However, the freeze-thaw cycle at -80°C caused platelet activation (data in press) and GF release (Zimmermann et al. 2002). All products were treated

identically and the results reflect instant humoral GF concentrations. Similarly to mPPP, ACP showed low GF concentrations and these levels were significantly lower than in mPRP, although this was not the case for the platelet concentration. Mean PDGF-BB concentration in mPRP was 1.7-fold higher than both in ACP and mPPP. The mean TGF- β 1 concentration in mPRP was 1.8-fold higher than in mPPP and 2-fold higher than in ACP. These findings might also be explained by the relatively high leukocyte concentration in mPRP, as some of these cells also contain and release TGF- β 1 and PDGF-BB (Grotendorst et al. 1989, Hughes et al. 1996, Zimmermann et al. 2003). Moreover, as mentioned above, the different anticoagulants used may have also played a role.

Platelet activation level

mPRP was expected to show higher MPV and lower MPC values than ACP, due to the double spin protocol and the use of sodium citrate instead of ACD-A. However, no early degranulation and no substantial GF loss in the supernatant mPPP seemed to have occurred during mPRP preparation, as no statistically significant difference between the MPC and MPV values of the three fresh products were detected. Stronger RCF might therefore be applicable to enhance cell sedimentation during the second spin without inducing significant loss of GFs.

Pearson's correlations

It is generally accepted, that platelet concentration obtained in an mPRP product is positively correlated to the PDGF-BB and TGF- β 1 concentrations (Zimmermann et al. 2003, Suter et al. 2004, Sundman et al. 2011). This has been confirmed in the present study. However, platelet and GF concentrations did not correlate in ACP. The slow centrifugation as well as ACD-A might account for the lack of GF release in plasma. The mechanical stimulation using a laboratory vortex, as done during mPRP preparation, or a chemical activation would have possibly induced higher platelet-GF correlations in ACP. Furthermore, this study demonstrates that the total leukocyte amount did not seem to linearly influence the GF concentrations in the present protocols as no significant correlations were found between these parameters. However, correlation was calculated for the total amount of leukocytes. The subpopulation of these cells might differ between the products and some leukocyte types may influence the GF composition more than others (Sundman et al. 2011). As no differential blood count was performed, this cannot be confirmed here.

Limitations of this study

There are some clear limitations to this study. Firstly, the low number of horses involved in this trial, due to financial restrictions, limits the statistical power of the results. However, it is comparable to other similar published studies (Sundman et al. 2011, Kissich et al. 2012, Textor and Tablin 2012). Besides, it would have been very interesting to include more commercial kits in this comparison, but again the

study budget was too limited. Moreover, it is important to note that this is an in vitro trial and that further clinical comparative experiments are needed to better understand the meaning and the influence of these laboratory results on the clinical effect, as other factors may play an important role in tissue regeneration. Finally, the results of the "in-house" mPRP technique in this study cannot be extrapolated to other similar double centrifugation tube methods as these are prepared using different processing parameters.

Conclusions

Results from this study indicate that the ACP preparation is fast and easy to perform as opposed to the mPRP processing, which is laborious and time consuming. ACP showed a moderate mean platelet concentration and relatively low mean leukocyte and humoral GF levels, which were similar to those in mPPP. This could account for possible unsatisfactory clinical results for this commercial method. Although mPRP showed higher mean platelet and GF concentrations than ACP, these values were inferior to our expectations and may also be insufficient for an optimal effect in practice. Moreover, it showed a relatively high mean leukocyte concentration, which could induce local unwanted inflammatory reactions. The "in house" preparation protocol of mPRP presented here must therefore be optimized before it can be recommended for the use in equine practice. The mPRP and ACP methods both showed low absolute platelet and GF levels. Further comparative clinical studies are needed to confirm if these values were sufficient to induce a satisfactory clinical effect. Other mPRP protocols and commercial systems described in the equine medical literature are more efficient in achieving higher platelet and GF concentrations and should be considered by the clinicians, who must be aware of these differences when applying these blood-derived products.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest. Arthrex GmbH financed the ELISA kits and hematologic examinations and provided the ACP® syringes.

Acknowledgement

We would like to thank the team of the hematological laboratory of the Large Animal Clinic for Internal Medicine and Ms. Lochmann for their contribution to this work. A part of these results has been presented on the 4th of November 2011, during the IVRMS Session at the 2011 World Conference on Regenerative Medicine in Leipzig:

References

- Alvarez M. E., Giraldo C. E., Carmona J. U. (2010) Monitoring bacterial contamination in equine platelet concentrates obtained by the tube method in a clean laboratory environment under three different technical conditions. *Equine Vet. J.* 42, 63-67
- Anitua E., Andia I., Ardanza B., Narden P., Narden A. T. (2003) Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 91, 4-15

- Anitua E., Aguirre J. J., Algorta J., Ayerdi E., Cabezasa A. I., Orive G., Andia I. (2008) Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 84, 415-421
- Argüelles D., Carmona J. U., Pastor J., Iborra A., Viñals L., Martínez P., Bach E., 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., Climent F., Muñoz E., Prades M. (2008) Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Vet. Rec.* 162, 208-211
- Beard M. J., Jeewa Z., Bashir S., Cardigan R., Thomas S. (2011) Comparison of platelet activation in platelet concentrates measured by flow cytometry or ADVIA 2120. *Vox Sang.* 101, 122-130
- Bosch G., van Schie H.T., de Groot M. W., Cadby J. A., van de Lest C. H., Barneveld A., van Weeren P. R. (2010) Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *J. Orthop. Res.* 28, 211-217
- Boswell S. G., Cole B. J., Sundman E. A., Karas V., Fortier L. A. (2012) Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 28, 429-439
- Carter C. A., Jolly D. G., Worden C. E., Hendren D. G., Kane C. J. M. (2003) Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp. Mol. Pathol.* 74, 244-255
- Castelijns G., Crawford A., Schaffer J., Ortolano G.A., Beauregard T., Smith R. K. (2011) Evaluation of a filter-prepared platelet concentrate for the treatment of suspensory branch injuries in horses. *Vet. comp. orthopaed. traum.* 24, 363-369
- DeLong J. M., Russell R. P., Mazzocca A. D. (2012) Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy* 28, 998-1009
- Dohan Ehrenfest D. M., Rasmusson L., 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
- Dragoo J. L., Braun H. J., Durham J. L., Ridley B. A., Odegaard J. I., Luong R., Arnoczky S. P. (2012) Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am. J. Sports Med.* 40, 1274-1281
- Eppley B. L., Woodell J. E., Higgins J. (2004) Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 1502-1508
- Eppley B. L., Pietrzak W. S., Blanton M. (2006) Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 118, 147e-159e
- Geburek F., Stadler P. (2011) Regenerative therapy for tendon and ligament disorders in horses. Terminology, production, biologic potential and in vitro effects. *Tierärztl. Prax. G./N.* 39, 373
- Giraldo C. E., Lopez C., Alvarez M. E., Samudio I. J., Prades M., Carmona J. U. (2013) Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet. Res.* 9, 29
- Giusti I., Rughetti A., D'Ascenzo S., Millimaggi D., Pavan A., Dell'Orso L., Dolo V. (2009) Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells. *Transfusion (Paris)* 49, 771-778
- Gonshor A. (2002) Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 22, 547-557
- Grotendorst G. R., Smale G., Pencev D. (1989) Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J. Cell. Physiol.* 140, 396-402
- Hall M. P., Band P. A., Meislin R. J., Jazrawi L. M., Cardone D. A. (2009) Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 17, 602-608
- Hughes A., Clunn G., Refson J., Demoliou-Mason C. (1996) Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *Gen. Pharmacol.Vasc.* 27, 1079-1089
- Kissich C., Gottschalk J., Lochmann G., Einspanier A., Böttcher P., Winter K., Brehm W., Ionita J.-C. (2012) Biochemische Eigenschaften des Autologous Conditioned Plasma® (ACP). *Pferdeheilkunde* 28, 258-267
- Lei H., Gui L., Xiao R. (2009) The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin. Biochem.* 42, 1452-1460
- Lopez-Vidriero E., Goulding K. A., Simon D. A., Sanchez M., Johnson D. H. (2010) The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 26, 269-278
- Maciel F. B., DeRossi R., Modolo T. J., Pagliosa R. C., Leal C. R., Delben A. A. (2012) Scanning electron microscopy and microbiological evaluation of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel treatment. *Burns* 38, 1058-1065
- Maia L., de Souza M. V., Ribeiro Júnior J. I., de Oliveira A. C., Alves G. E. S., dos Anjos Benjamin L., Silva Y. F. R. S., Zandim B. M., Moreira J. C. L. (2009) Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. *J. Equine Vet. Sci.* 29, 618-626
- Marx R. E. (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62, 489-496
- Pedzisz P., Zgoda M., Kocon H., Benke G., Gorecki A. (2010) Treatment of solitary bone cysts with allogenic bone graft and platelet-rich plasma. A preliminary report. *Acta Orthop. Belg.* 76, 374-379
- Pietrzak W. S., Eppley B. L. (2005) Platelet rich plasma: biology and new technology. *J. Craniofac. Surg.* 16, 1043-54
- Rindermann G., Cislakova M., Arndt G., Castanjen B. (2010) Autologous conditioned plasma as therapy of tendon and ligament lesions in seven horses. *J. Vet. Sci.* 11, 173-175
- Segura D., Monreal L., Armengou L., Tarancón I., Brugués R., Escobar G. (2007) Mean platelet component as an indicator of platelet activation in foals and adult horses. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 1076-1082
- Sundman E. A., Cole B. J., Fortier L. A. (2011) Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am. J. Sports Med.* 39, 2135-2140.
- Sutter W. W., Kaneps A. J., 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
- Textor J. (2011) Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* 27, 275-298
- Textor J. A., Tablin F. (2012) Activation of equine platelet-rich plasma: Comparison of methods and characterization of equine autologous thrombin. *Vet. Surg.* 41, 784-94
- Theoret C. L. (2004) Wound repair in the horse: Problems and proposed innovative solutions. *Clin. Tech. Equ. Pract.* 3, 134-140
- Toricelli P., Fini M., Filardo G., Tschon M., Pisedda M., Pacorini A., Kon E., Giardino R. (2011) Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *Int. Orthop.* 35, 1569-1576
- Waselau M., Sutter W. W., Genovese R. L., Bertone A. L. (2008) Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 232, 1515-1520
- Zimmermann R., Jakubietz R., Jakubietz M., Strasser E., Schlegel A., Wiltfang J., Eckstein R. (2002) Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion (Paris)* 41, 1217-1224
- Zimmermann R., Arnold D., Strasser E., Ringwald J., Schlegel A., Wiltfang J., Eckstein R. (2003) Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang.* 85, 283-289

Vergleich von Zell- und Wachstumsfaktorkonzentrationen in equinem Autologous Conditioned Plasma (ACP®) und manuell hergestelltem Platelet Rich Plasma (mPRP)

Zusammenfassung: Autologous Conditioned Plasma® (ACP) wird routinemäßig zur Therapie von orthopädischen Erkrankungen bei Pferden eingesetzt, und ist durch eine mäßige supraphysiologische Thrombozytenkonzentration gekennzeichnet. Diese könnte aber möglicherweise nicht ausreichend sein, um optimale geweberegenerative Effekte zu erzielen. Aufgrund wesentlich geringerer Kosten und gegebenenfalls höherer Thrombozytenkonzentrationen, wird stattdessen häufig auf nicht-kommerzielle, manuelle Doppelzentrifugierungsmethoden (mPRP) zurückgegriffen. Die mPRP Aufbereitung ist allerdings umständlich und nicht standardisiert. Um herauszufinden ob eine „hausinterne“ mPRP Methode eine wertvolle Alternative zu ACP in der Praxis sein kann, war das Ziel dieser Studie das manuell hergestellte Produkt mit der kommerziellen Methode im Hinblick auf deren Aufbereitungstechnik, Ausmaß der Plättchenaktivierung (bestimmt durch die Messung des „mean platelet volume“ (MPV) und des „mean platelet component“ (MPC)), sowie absolute Thrombozyten-, Leukozyten-, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) und platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) Konzentrationen zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden bei 10 erwachsenen gesunden Pferden alle diese Parameter in jeweils ACP, mPRP und dessen thrombozytenarmen Plasma (mPPP) bestimmt. Die mittlere Thrombozyten-Konzentration lag im mPRP bei $221,4 \pm 60,3 \times 10^9/l$ und war 1,2- bzw. 1,4-fach höher als im ACP und mPPP. Die mittlere Leukozyten-Konzentration im mPRP lag bei $25,8 \pm 10,9 \times 10^9/l$ und war 32,3- und 19,9-fach höher als im ACP und mPPP. Die mittlere Konzentration von PDGF-BB im mPRP ($1,81 \pm 0,58 \text{ ng/ml}$) war 1,7-fach höher als im ACP und mPPP. Die mittlere TGF- β 1 Konzentration ($3,62 \pm 1,16 \text{ ng/ml}$) lag 2- und 1,8-fach über den Werten im ACP bzw. mPPP. MPC erreichte $20,3 \pm 1,3 \text{ g/l}$ im mPRP, $20,6 \pm 1,6 \text{ g/l}$ im ACP bzw. $20,4 \pm 1,7 \text{ g/l}$ im mPPP. MPV war $8,6 \pm 0,7 \text{ fl}$ im mPRP, $8,7 \pm 1,0 \text{ fl}$ im ACP und $8,4 \pm 0,9 \text{ fl}$ im mPPP. Die Aufbereitung von ACP konnte schnell und einfach durchgeführt werden, hingegen war die Herstellung von mPRP aufwendig und zeitintensiv. Im Vergleich zu ACP, erzielte die „hausinterne“ mPRP Methode eine geringfügig höhere Thrombozyten-Konzentration in einem allerdings deutlich kleineren Endvolumen. Die mittleren Leukozyten-, TGF- β 1 und PDGF-BB Konzentrationen im mPRP waren signifikant höher als in ACP und mPPP, welche beide ähnliche Werte zeigten. Die hohe mittlere Leukozyten-Konzentration im mPRP könnte außerdem zu unerwünschten lokalen Entzündungsreaktionen führen. Der Grad der Plättchen-Aktivierung war ähnlich in den drei Plasma-Produkten. Die in dieser Studie beschriebene „hauseigene“ mPRP Vorbereitungsmethode sollte daher zuerst überarbeitet und optimiert werden, bevor sie zum Einsatz bei Pferden empfohlen werden kann. Im Vergleich zu anderen in der Literatur berichteten equinen Plättchenkonzentrationen, zeigten mPRP und ACP niedrige absolute Thrombozyten- und GF-Konzentrationen auf. Zusätzliche vergleichende klinische Studien sind nötig, um herauszufinden, ob diese Werte ausreichend für eine zufriedenstellende klinische Wirkung waren.

Einleitung

Der Einsatz von autologen Thrombozytenkonzentrationen (ATK) als Therapie für Sehnenschäden ist in der Pferdemedizin weit verbreitet (Argüelles et al. 2008, Waselau et al. 2008, Bosch et al. 2010, Rindermann et al. 2010, Castelijns et al. 2011, Geburek und Stadler 2011). Dabei werden die Thrombozyten (TZ) in geringem Plasmavolumen (oder anderer Basislösung)

konzentriert, um intraläsional bzw. topisch appliziert zu werden (Gonshor 2002, Anitua et al. 2003, Marx 2004, Argüelles et al. 2006, Textor 2011).

Als regenerativmedizinische Verfahren, basieren ATK vermutlich auf der Wirkung von Wachstumsfaktoren (GF) und anderen Molekülen, die in den alpha-Granula der TZ, in Leukozyten (LZ) und im Plasma enthalten sind. Daher wird angenommen, dass TZ-, GF- und LZ-Konzentrationen ausschlaggebende biologische Parameter für den klinischen Effekt von ATK sind (DeLong et al. 2012).

Um in der Humanmedizin ein ATK als „platelet rich plasma“ (PRP) bezeichnen zu können, wurde eine Mindestkonzentration von $200 \times 10^9/l$ TZ vorgeschlagen (Boswell et al. 2012). Andere Autoren hingegen erstreben eine Konzentrationsspanne zwischen $300 \times 10^9/l$ und $1500 \times 10^9/l$ an TZ in ATK, um die besten therapeutischen Effekte zu erzielen (Anitua et al. 2003, Giusti et al. 2009, Textor et al. 2011). Jedoch fehlt in der Pferdemedizin bis dato immer noch eine richtige Definition von ATK, und diese werden (manchmal fälschlicher Weise) oft unter dem Begriff PRP zusammengefasst.

Durch die Degranulation der TZ werden GF wie zum Beispiel platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) und transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in relativ hohen Konzentrationen freigesetzt (Eppley et al. 2004, Pietrzak und Eppley 2005, Eppley et al. 2006, Textor und Tablin 2012), um den Prozess der Wundheilung zu fördern und zu steuern (Anitua et al. 2003, Carter et al. 2003, Theoret 2004, Anitua et al. 2008). Es gibt diverse Messmethoden der TZ-Aktivierung. Eine einfache Methode bietet der automatisierte zytometrische hämatologische Analysator ADVIA 120 (Siemens, Deutschland) an, in dem er das Volumen und den Brechungsindex der TZ misst, um das „mean platelet volume“ (MPV) bzw. das „mean platelet component“ (MPC) zu liefern. Das MPV stellt die Größe der TZ dar und steigt bei der TZ-Aktivierung (TZ transformieren sich von deren Scheibenform im Ruhezustand zu aktivierten geschwollenen Kugeln) an. Das MPC verhält sich linear zu TZ-Dichte und nimmt somit nach Degranulation ab. Beide Parameter werden als zuverlässige Indikatoren für die TZ-Aktivierung genutzt (Segura et al. 2007, Beard et al. 2011).

Autologous Conditioned Plasma® (ACP) ist ein auf Blutplasma basierendes ATK, welches in der Pferdeorthopädie häufig zum Einsatz kommt, da dessen Herstellung einfach mittels einmaliger, relativ sanfter und kurzer Zentrifugierung in einer patentierten Doppelspritze erfolgt. Die besonderen Merkmale dieses Produktes sind eine moderate supraphysiologische TZ-Konzentration bei niedriger LZ-Konzentration. Dies wurde in einer Studie über die Validierung der Aufbereitungsmethode von ACP beim Pferd demonstriert. ACP erreichte dabei eine mittlere absolute TZ-Konzentration von $219 \times 10^9/l$ und eine TZ Anreicherung von 149% ($\pm 20\%$) verglichen mit den Blutbasalwerten (Kissich et al. 2012). Folglich lag dessen TZ-Konzentration unter der anderer ATK bei Pferden (Waselau et al. 2008, Bosch et al. 2010, Castelijns et al. 2011) und könnte zu gering sein, um optimale geweberegenerierende Effekte zu erzielen.

Auf Grund deutlich niedrigerer Kosten und möglicherweise höherer TZ-Konzentrationen, werden von vielen Tierärzten

nicht-kommerzielle Doppelzentrifugierungsmethoden (erste Zentrifugierung sanft, zweite Zentrifugierung hart) bevorzugt, um PRP herzustellen (hier als mPRP bezeichnet). *Argüelles et al.* (2006) beschrieben eine Technik zur Herstellung von mPRP bei Pferden, dem folgten aber weitere Beschreibungen verschiedener Herstellungsmethoden (*Toricelli et al.* 2011, *Maciel et al.* 2012). Demzufolge gibt es, im Gegensatz zu ACP und anderen kommerziell erhältlichen Kits, keine einheitlich standardisierte Methode für die mPRP Herstellung. Unangepasste Aufbereitungsparameter können zu unzufriedenstellenden Zellkonzentrationen und somit zu schlechter Bioaktivität des mPRP beim Pferd führen. Zusätzlich ist dessen Herstellung aufwändig, zeitintensiv und erfordert etwas Geschicklichkeit, was für die Routine Anwendung nachteilig sein kann. Dazu könnte der Herstellungsprozess von mPRP die Morphologie und die Funktion der TZ verändern und zu einer zu frühen Aktivierung führen. Dadurch könnten eingesetzte GF in das darüberliegende, nicht gebrauchte platelet poor plasma (mPPP) verloren gehen (*Textor* 2011).

Um herauszufinden ob eine „hausinterne“ mPRP Herstellungstechnik eine wertvolle Alternative zu ACP in der Pferdepraxis sein kann, war das Ziel dieser Studie das manuelle Produkt mit der kommerziellen Methode im Hinblick auf die Praktikabilität deren Präparationsprozess, sowie auf deren absolute Thrombozyten-, Leukozyten-, TGF- β 1 und PDGF-BB-Konzentrationen (welche deren Bioaktivität beeinflussen können) zu vergleichen. Außerdem wurden die MPV und MPC gemessen, um herauszufinden, ob die Herstellung von mPRP eine vorzeitige TZ-Aktivierung auslöst.

Material und Methode

Im Rahmen einer genehmigten Tierversuchsanzeige (V10/11) wurden für die Studie 10 gesunde Warmblutpferde (3 Stuten, 5 Wallache und 2 Hengste, Alter 12 ± 6 Jahre) herangezogen. Die Pferde wiesen keine systemischen Erkrankungen und keine Auffälligkeiten in den hämatologischen Untersuchungen auf. Die Probanden erhielten zwei Wochen vor und während der Studie keine Medikation. Die Pferde wurden in Boxen gehalten und erhielten Heu und Wasser ad libitum.

Blutentnahme

Für die Blutentnahme wurde die Drosselrinne linksseitig im Bereich der Vena jugularis geschoren und aseptisch vorbereitet. Danach wurde ein 14 gauge Venenkatheter (Braunüle Vasocan®: B-Braun AG, Melsungen, Deutschland) kopfwärts in die Vene eingebracht. Die hämatologischen Untersuchungen (inklusive MPV und MPC) erfolgten automatisiert mittels Zellzähler (ADVIA® 120: Siemens AG, München, Deutschland). Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmung.

ACP-Herstellung

Autologous Conditioned Plasma® (ACP®: Arthrex GmbH, München, Deutschland) wurde wie von *Kissich et al.* (2012) beschrieben aufbereitet. Kurz geschildert wurden 1 ml ACD-A (noClot-400™: Cytosol Laboratories, Braintree, USA) und 9 ml Blut in die größere äußere Spritze (des Doppelspritzensystems) vorsichtig aufgezogen und vermischt. Die Proben wurden unverzüglich bei 1100 U/min (189 g) für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge: Rotofix 32A®: Rotor 1324, Andreas Hettich,

GmbH&Co. KG, Tuttlingen, Deutschland; Becher: SK 18.06-3: Andreas Hettich, GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Danach wurden 5,5 ml des Plasmaüberstandes in die innen liegende 6 ml Spritze abgezogen. Es erfolgte eine Zeitmessung von der Blutentnahme bis zur Fertigstellung des Produktes. Danach wurden die ACP-Proben in 3 Kryokonservierungsröhrchen (Cryo tubes 2,0 ml: Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) aliquotiert. Eines davon wurde direkt zur Zellzahlbestimmung verwendet, die anderen zwei wurden bei -80°C für spätere PDGF-BB und TGF- β 1 Bestimmungen eingefroren.

mPRP-Herstellung

Die Herstellung von mPRP wurde mit einer „hausinternen“ Doppelzentrifugierungsmethode, mittels der (von den Autoren der Studie) Pferde in der Vergangenheit behandelt wurden (unveröffentlicht). Direkt nach der ACP-Herstellung wurden 2×9 ml Blut von jedem Pferd in zwei Plastikröhrchen (diese enthielten 1 ml Na-Citrat) entnommen (10 ml S-Monovette™: Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland), vorsichtig gemischt und bei $900 \text{ U/min} \times 5 \text{ min}$ (127 g) zentrifugiert (mit derselben Zentrifuge wie oben beschrieben unter Verwendung andere Becher: 1390: Andreas Hettich, GmbH&Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Nach der ersten Zentrifugierung wurde der Plasmaüberstand in 2 gleiche Teile geteilt: eine obere Fraktion (arm an TZ) und eine untere Fraktion (reich an TZ). Die obere Fraktion wurde mittels einer 5 ml Spritze und einer 7 cm langen 22 gauge Kanüle von oben nach unten abgezogen und verworfen. Danach wurden, die untere Plasmafraktion und der buffy coat beider Röhrchen abgezogen und in ein leeres Polypropylenröhrchen (12 ml Zentrifugierungsröhrchen: Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) verbracht, um folglich bei $1200 \text{ U/min} \times 5 \text{ min}$ (225 g) zentrifugiert zu werden. Das nun gewonnene Plasma wurde erneut in zwei Fraktionen getrennt. Die oberen 75% der Plasmafraktion hier als platelet poor plasma (mPPP) bezeichnet, wurden vorsichtig abgezogen. Die untere Fraktion, bestehend aus einer kleinen Zellanhäufung, wurde als platelet rich plasma (mPRP) definiert. Die Zellen des mPRP wurden zuerst unter Verwendung eines Zellvortex (Lab Dancer Vario®, IKA Werke GmbH&Co., Staufen, Deutschland) resuspendiert und danach mit einer separaten Spritze abgezogen. Dabei wurde die Zeit von der Blutentnahme bis zur Fertigstellung des Produktes gemessen.

Jede mPRP und mPPP Probe wurde in drei gleiche Teile in Kryokonservierungsröhrchen (Cryo tubes 2.0 ml: Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) aliquotiert. Eines davon wurde direkt zur Zellzahlbestimmung verwendet, die anderen zwei wurden bei -80°C für spätere PDGF-BB und TGF- β 1 Bestimmungen eingefroren.

Wachstumsfaktormessungen

Es wurden die Konzentrationen von PDGF-BB und TGF- β 1 im ACP, mPRP und mPPP mittels humaner „sandwich“ ELISA Kits (ELISA, Quantikine Human TGF- β 1 und Quantikine PDGF-BB: R&D Systems, Minneapolis, USA) gemessen. Die Messungen erfolgten laut Herstellerangaben und interner Validierung (beschrieben durch die Studie von *Kissich et al.* (2012)). Die Plasmaproben wurden vor den Messungen über einen Zeitraum von zwei Monaten bei -80°C aufbewahrt. Alle ELISA Messungen erfolgten in Doppelbestimmung.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mittels SPSS® 20 für Windows® (IBM, Deutschland) durchgeführt. Alle Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet und anschließend mittels One-Way ANOVA und folgendem t-Test auf Signifikanzen untersucht. Die bivariate Korrelationsanalyse der Zell- und GF-Konzentrationen wurde unter Verwendung des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Das zweiseitige Signifikanzniveau für alle Tests und Korrelationen betrug $p < 0,05$.

Ergebnisse

Die ACP-Herstellung nahm in etwa eine Zeit von 10 Minuten in Anspruch, wogegen die Herstellung von mPRP zeitaufwändiger (35 min) war. Das Endvolumen des ACPs variierte je nach Patient zwischen 6 und 7 ml, jedoch konnten lediglich 5,5 ml in die innere Spritze aufgezogen werden ohne Erythrozyten mitzuaspirieren. Das Endvolumen von mPRP lag bei 1,5 ml und das von mPPP bei 4,5 ml. Ein Pferd wurde auf Grund aberranten Ergebnissen aus der Studie ausgeschlossen, wodurch sich eine Probandenzahl von $n = 9$ ergab. Die abnormen Ergebnisse resultierten vermutlich aus Messfehlern während der mPRP Herstellung. Zusätzlich fehlten die Ergebnisse der MCV und MPC Werte vom ACP eines anderen Pferdes, wodurch sich in diesem Fall eine bleibende Probandenzahl von $n = 8$ ergab. Wiederholte Zellzahlmessungen lieferten sonst in allen drei Produktgruppen konstante Ergebnisse.

TZ-Konzentration

Die höchste mittlere TZ-Konzentration wurde im mPRP gemessen ($221,4 \pm 60,3 \times 10^9/l$), gefolgt von ACP ($192,4 \pm 31,5 \times 10^9/l$) und mPPP ($163,1 \pm 24,0 \times 10^9/l$) [Fig.1] mit einem signifikanten Unterschied zwischen mPRP und mPPP ($p = 0,007$).

LZ-Konzentration

Die mittlere LZ-Konzentration war im mPRP am höchsten ($25,8 \pm 10,9 \times 10^9/l$), gefolgt von mPPP ($1,3 \pm 0,6 \times 10^9/l$) und ACP ($0,8 \pm 0,2 \times 10^9/l$) [Fig.2]. Es konnten hoch signifikante Unterschiede zwischen ACP und mPRP ($p < 0,001$) und zwischen mPPP und mPRP ($p < 0,001$) festgestellt werden. Ebenso konnte ein signifikanter Unterschied zwischen ACP und mPPP ($p = 0,027$) aufgezeigt werden.

PDGF-BB-Konzentration

Die mittlere PDGF-BB-Konzentration war im mPRP am höchsten ($1,81 \pm 0,58 \text{ ng/ml}$), gefolgt von ACP ($1,07 \pm 0,28 \text{ ng/ml}$) und mPPP ($1,04 \pm 0,27 \text{ ng/ml}$) [Fig.3]. Zwischen mPPP und mPRP konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p = 0,002$).

TGF-β1-Konzentration

Die mittlere TGF-β1 Konzentration war im mPRP am höchsten ($3,63 \pm 1,16 \text{ ng/ml}$), gefolgt von mPPP ($2,01 \pm 0,54 \text{ ng/ml}$) und ACP ($1,80 \pm 0,71 \text{ ng/ml}$) [Fig.4]. ACP und mPRP ($p < 0,001$), als auch mPPP und mPRP ($p = 0,001$) unterschieden sich signifikant voneinander.

MPV (mean platelet volume)

Die mittleren MPV Messwerte lagen bei $8,68 \pm 0,97 \text{ fl}$ im ACP, $8,37 \pm 0,86 \text{ fl}$ im mPPP und bei $8,58 \pm 0,67 \text{ fl}$ im mPRP [Fig.5]. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

MPC (mean platelet component)

Die mittleren MPC Messwerte lagen bei $20,61 \pm 1,67 \text{ g/l}$ im ACP, bei $20,65 \pm 1,59 \text{ g/l}$ im mPPP und bei $20,48 \pm 1,27 \text{ g/l}$ im mPRP [Fig.6]. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Pearsonscher Korrelationskoeffizient

ACP

PDGF-BB- und LZ-Konzentrationen zeigten eine signifikant negative Korrelation ($r = -0,757$, $p = 0,018$).

mPRP

Es konnte eine hoch signifikante positive Korrelation zwischen PDGF-BB- und TZ-Konzentrationen ($r = 0,802$, $p = 0,009$) nachgewiesen werden. Ebenso zeigten TGF-β1- und TZ-Konzentrationen eine signifikant positive Korrelation ($r = 0,752$, $p = 0,019$).

mPPP

Zwischen PDGF-BB- und TZ-Konzentrationen konnte eine signifikant positive Korrelation ($r = 0,687$, $p = 0,041$) nachgewiesen werden.

MPV/MPC

Durch Einfrieren und Auftauen der Proben kommt es zur TZ-Aktivierung (Veränderung von MPC/MPV) und dadurch zur Freisetzung der GF. Weil die Messung der GF nach der Kryokonservierung erfolgte, und MPV/MPC dem folgend nicht nochmals bestimmt wurden, können in diesem Fall keine Korrelationen durchgeführt werden.

Diskussion

Zurzeit gibt es viele verschiedene Herstellungssysteme für ATK auf dem Markt. Jedoch sind das ACP und das manuell – mittels Doppelzentrifugierungsmethode – hergestellte Plasma (mPRP) zwei der meist verwendeten Methoden in der Pferdemedizin in Europa. Um herauszufinden ob mPRP eine wertvolle und kostengünstige Alternative zu ACP darstellt, wurden 1) die Praktikabilität der Herstellungsmethoden beider Techniken verglichen, sowie 2) die Zell- und GF-Konzentrationen, als auch 3) deren MPC/MPV Werte bestimmt, weil diese Faktoren maßgeblich für die Bioaktivität und den klinischen Effekt ausschlaggebend sind.

Herstellung

Da es keine einheitliche Methode zur mPRP Herstellung in der Pferdemedizin existiert, erfolgte dessen Aufbereitung laut eines „hausinternen“ bestehenden Protokolls unserer Arbeitsgruppe. Verglichen mit anderen Methoden (Alvarez et al. 2010, Torricelli et al. 2011, Maciel et al. 2012) wurde hier eine relativ sanfte Zentrifugierung verwendet, um eine vorzeitige Plättchenaktivierung - und dadurch möglichen Verlust der GF ins mPPP - während des zweiten Zentrifugierungsschrittes zu ver-

meiden (Eppley et al. 2006, Textor 2011). Die Herstellung von ACP war einfach auszuführen und benötigte insgesamt weniger als 10 Minuten, während die mPRP Herstellung etwa 35 Minuten dauerte. Bei der ACP-Herstellung wurde eine Rotorbremse verwendet, um die Zentrifuge sehr schnell zum Stillstand zu bringen. Dies erwies sich für die mPRP-Herstellung als ungünstig, da es dabei in Vorversuchen zur Aufwirbelung von Erythrozyten ins Plasma kam. Das Endvolumen von ACP ergab 5,5 ml, wogegen das von mPRP nur 1,5 ml betrug.

Die hier angewandten Methoden unterscheiden sich zusätzlich im zugegebenen Antikoagulans. Für die ACP-Herstellung wurde ACD-A als Antikoagulans verwendet, indessen für die Herstellung von mPRP mit Natrium-Citrat vorgefüllte Röhrchen auf Grund des kostengünstigen Preises und der weit verbreiteten Verwendung in der Pferdemedizin in Deutschland benutzt wurden. Es wurde nachgewiesen, dass ACD-A einen besseren zellstabilisierenden Effekt als Natrium-Citrat aufweist (Lei et al. 2009). Der dadurch im ACP entstehende Anti-Aktivierungseffekt könnte ein Grund für die niedrigere GF-Konzentration im ACP sein. Bei der Verwendung von Natrium-Citrat kann dazu, wie in Voruntersuchungen gezeigt wurde, häufiger Plättchenagglutination beobachtet werden. Dadurch kommt es einerseits zu einer Verringerung der messbaren TZ-Zahl im Blutmessgerät, andererseits erhöht sich möglicherweise die Zahl der GF die durch diese Zellen freigesetzt werden.

TZ-Konzentration

Das Ziel dieser Studie war es nicht, die Effektivität der Anreicherung von TZ zweier Techniken in Relation zu den Basalwerten zu untersuchen, sondern die absolute Zell- und GF-Konzentration zweier Endprodukte zu vergleichen. Das Interesse entwickelt sich immer mehr auf die absolute Konzentration einiger Faktoren und weniger auf deren Anreicherungsfaktoren (Textor 2011). Der wichtigste Grund ist die interindividuelle Variabilität von Zell- und Zytokinkonzentrationen (Giraldo et al. 2013). Nur weil ein Produkt signifikant hohe TZ Anreicherung erzielt, kann es trotzdem sein, dass dessen absolute Konzentration unterhalb des klinisch effektiven Bereiches liegt (welcher in der Pferdemedizin noch bestimmt werden muss). Aus diesem Grund wurde in dieser Studie nicht auf TZ-Basalwerte im Blut und auf die Anreicherungsfaktoren in den Produkten eingegangen.

Kissich et al. (2012) konnten mittels des hier angewandten Protokolls eine recht konstante aber relativ tiefe mittlere TZ-Anreicherung von $149 \pm 20\%$ für ACP erreichen. Auf Grund der Tatsache, dass beim ACP das gesamte Plasmavolumen verwendet wird, das unmittelbar mit dem Hämatokrit zusammenhängt, ergibt sich eine geringere Endkonzentration an TZ verglichen mit anderen kommerziellen ATK (Bosch et al. 2010, Castelijns et al. 2011). Physiologischer Weise variiert der Hämatokrit des Pferdes zwischen 30% und 40%. In equinem ACP kann deswegen höchstens eine 143%–167%ige Erhöhung der TZ-Konzentration verglichen mit Blutbasalwerten erzielt werden.

Die mittlere Thrombozyten-Konzentration in mPRP ($221,4 \pm 60,3 \times 10^9/l$) war 1,2 Mal höher als in ACP ($192,4 \pm 31,5 \times 10^9/l$) und 1,4 Fach höher als in mPPP ($163,1 \pm 24,0 \times 10^9/l$). Diese Werte sind deutlich unterhalb der projizierten absoluten Konzentrationen von $1-1,5 \times 10^{10}/l$,

die beim Menschen einen optimalen gewebsregenerativen Effekt induzieren (Giusti et al. 2009, Textor 2011) und möglicherweise zu niedrig, um eine zufriedenstellende klinische Wirkung bei Pferden zu erreichen. Andere Studien berichten über viel höhere Konzentrationen bei der mPRP Zentrifugierungstechnik (Argüelles et al. 2006, Maia et al. 2009, Torricelli et al. 2011), höchstwahrscheinlich aufgrund eines stärkeren zweiten Zentrifugierungsschrittes in ihrem Protokoll. Eine Reduzierung des Endplasmavolumens (von 25% auf 10% des gesamten Plasmavolumens), in dem das Thrombozytenpellet sich nach der zweiten Zentrifugierung befindet, würde die Thrombozyten-Konzentration in der mPRP erhöhen (Daten nicht gezeigt). Die Erhöhung der relativen Zentrifugierungskraft (RCF) während der zweiten Zentrifugation würde außerdem eine stärkere Zellsedimentation induzieren, was durch die unerwartete, relativ hohe Thrombozyten-Konzentration in mPPP bestätigt wurde.

Leukozyten-Konzentration

Ob die LZ-Konzentration in einem ATK niedrige oder hohe Werte erreichen sollte ist sehr umstritten und könnte von der medizinischen Indikation abhängig sein (DeLong et al. 2012). mPRP ist eine Buffy-Coat-basierte Methode, während ACP ein Plasma-basiertes Produkt ist. Dementsprechend war die mittlere weißen Blutkörperchen (WBC)-Konzentration in mPRP am höchsten ($25,8 \pm 10,9 \times 10^9/l$). Fehlende Aspiration des Buffy-Coats nach der ersten Zentrifugierung würde die Leukozyten-Konzentration im mPRP gering halten, aber dies würde auch die Effizienz der Thrombozyten-Gewinnung stark mindern, da der Buffy-Coat auch einen großen Teil dieser Zellen enthält. Die Anzahl der Leukozyten im ACP war vergleichsweise sehr niedrig ($0,8 \pm 0,2 \times 10^9/l$), da der sehr dünn erscheinende Buffy-Coat nicht aufgesaugt wurde. Es wurde gezeigt, dass die WBC-Konzentration im ACP auf $11,9\% \pm 3,9\%$ der anfänglichen Konzentration im Vollblut stark reduziert wurde (Kissich et al. 2012).

Einige Autoren versuchen, die „Kontamination“ von ATK mit Leukozyten zu vermeiden. Diese werden auf Grund ihrer proinflammatorischen Aktivität als nachteilig für die Wundheilung angesehen (Dohan Ehrenfest et al. 2009, Sundman et al. 2011, DeLong et al. 2012). Andererseits existieren Studien, in denen leukozytenreiche ATK zu sehr zufriedenstellenden klinischen Ergebnissen geführt haben (Hall et al. 2009, Lopez-Vidriero et al. 2010, Pedzisz et al. 2010, Dragoo et al. 2012). Es wird angenommen, dass nicht nur die Gesamtzahl der Leukozyten, sondern auch die Verteilung derer Subpopulationen einen Einfluss auf den Effekt von ATK hat (DeLong et al. 2012, Yoshida und Murray 2012). Leider wurde bei den hiesigen Messungen kein Differenzialblutbild angefertigt. Der Einfluss von Leukozyten in ATK wurde bis dato noch nicht völlig erläutert und bedarf weiterer Forschung, um abgesicherte Empfehlungen geben zu können.

GF-Konzentration

In der vorliegenden Studie wurden die ATK vor dem Einfrieren nicht exogen aktiviert, da dies in der klinischen Pferdepraxis nicht üblich ist (Textor 2011). Es wird angenommen, dass durch die lokale Interaktion zwischen Blutplättchen und Kollagen nach der intraläsionalen Injektion eine Degranulation hervorgerufen wird. Allerdings wurde durch das Einfrieren bei -

80°C und das Auftauen eine TZ-Aktivierung hervorgerufen (Daten in Press) und GF freigesetzt (Zimmermann et al. 2002). Jedoch wurden alle Proben gleich behandelt, und die Ergebnisse zeigen die momentanen humoralen GF-Konzentrationen.

In ACP konnten nur ähnlich niedrige GF-Konzentrationen wie im mPPP nachgewiesen werden. Diese waren signifikant niedriger als im mPRP, obgleich dies für die TZ-Konzentration nicht der Fall war. Die mittlere PDGF-BB-Konzentration im mPRP war 1,7-fach höher als im ACP und mPPP. Die mittlere TGF- β 1-Konzentration im mPRP war 1,8-fach höher als im mPPP und 2-fach höher als im ACP. Diese Ergebnisse erklären sich möglicher Weise zum Teil über die relativ hohe Leukozytenzahl im mPRP, weil ein Teil dieser Zellen ebenso TGF- β 1 und PDGF-BB enthält und in der Lage ist, sie freizusetzen (Grotendorst et al. 1989, Hughes et al. 1996, Zimmermann et al. 2003). Dazu, können die verschiedenen Antikoagulantien wie schon vorher erwähnt auch eine Rolle gespielt haben.

Grad der Thrombozytenaktivierung

Auf Grund der Verwendung von Natrium-Citrat an Stelle von ACD-A und der Doppelzentrifugierungsmethode wurde angenommen, dass mPRP höhere MPV und niedrigere MPC Messwerte als ACP aufweisen würde. Allerdings erfolgte anscheinend keine vorzeitige Degranulation der TZ oder ein Verlust von GF in das überstehende mPRP während der mPRP Herstellung, da keine statistisch signifikanten Unterschiede - bezüglich der MPC und MPV Messwerte- zwischen den drei frischen Plasmaprodukten festgestellt werden konnten. Daher wäre möglicherweise eine höhere RCF im zweiten Zentrifugierungsschritt anwendbar, um die Zellsedimentation zu verbessern ohne dass GF verloren gehen.

Korrelationen

Generell ist es anzunehmen, dass die TZ-Konzentration in mPRP positiv mit der Konzentration von PDGF-BB und TGF- β 1 korreliert ist (Zimmermann et al. 2003, Sutter et al. 2004, Sundman et al. 2011). Dies konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Jedoch konnte keine Korrelation zwischen TZ- und GF-Konzentration im ACP nachgewiesen werden. Die sanfte Zentrifugation sowie die Verwendung von ACD-A als Antikoagulans könnten Grund für die mangelnde GF-Freisetzung im Plasma sein. Die Verwendung eines Laborvortex (wie beim mPRP) sowie die chemische Aktivierung der TZ könnten eventuell höhere TZ-GF-Korrelationen im ACP herbeiführen. Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen den Fakt, dass die Leukozytenzahl keinen direkten linearen Einfluss auf die GF-Konzentration hat, da keine signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden konnten. Jedoch wurden die Korrelationen für die Gesamtleukozytenzahl berechnet. Die Subpopulationen der Leukozyten würden in den verschiedenen ATK möglicherweise unterschiedlich vorkommen, zudem beeinflussen manche Leukozytentypen die Art der GF Ausschüttung mehr als Andere (Sundman et al. 2011). Da in dieser Studie kein Differenzialblutbild angefertigt wurde, kann hier darauf nicht weiter eingegangen werden.

Grenzen der Studie

Die vorliegende Studie weist einige klaren Grenzen auf. Auf Grund finanzieller Einschränkungen konnten nur wenige Pfer-

de in diese Studie miteinbezogen werden, wodurch die statistische Aussagekraft eingeschränkt ist. Jedoch ist die Anzahl der Tiere mit der von anderen ähnlichen publizierten Versuchen vergleichbar (Sundman et al. 2011, Kissich et al. 2012, Textor und Tablin 2012). Außerdem wäre es sehr interessant gewesen, weitere kommerzielle Kits in diese Vergleichsstudie einzubeziehen, aber leider war auch dafür das Budget zu begrenzt. Ferner bleibt nicht zu vergessen, dass es sich hierbei um eine in vitro Studie handelt. Es sind weitere vergleichende klinische Experimente notwendig, um die Bedeutung und den Einfluss dieser in vitro Ergebnisse besser zu interpretieren, da weitere Faktoren eine wichtige Rolle auf die Geweberegeneration spielen können. Schlussendlich dürfen die Ergebnisse der „hausinternen“ mPRP Technik nicht auf andere ähnliche Doppelzentrifugierungsmethoden umgelegt werden, da diese andere Aufbereitungsparameter verwenden.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die ACP-Herstellung – verglichen mit der aufwändigeren und zeitintensiveren mPRP Herstellung – schnell und einfach ist. ACP wies eine moderate mittlere TZ-Konzentration und relativ geringe mittlere LZ- und humorale GF-Konzentrationen auf, welche ähnlich zu denen im mPPP waren. Dies könnte zu unzufriedenstellenden klinischen Ergebnissen bei der Anwendung dieser kommerziellen Methode führen. Obgleich mPRP höhere mittlere TZ- und GF-Konzentrationen als ACP aufwies, lagen die Ergebnisse unter unseren Erwartungen und sind möglicherweise auch zu gering für optimale klinische Effekte. Zudem zeigte mPRP eine relativ hohe mittlere LZ-Konzentration auf, was zu unerwünschten lokalen Entzündungsreaktionen führen könnte. Das hier verwendete „hausinterne“ Protokoll zur mPRP-Herstellung sollte aus diesem Grund noch optimiert werden, bevor es für den klinischen Einsatz empfohlen werden kann. Die mPRP- und ACP-Methoden wiesen beide niedrige absolute TZ- und GF-Niveaus auf. Zusätzliche vergleichende klinische Studien sind nötig, um herauszufinden, ob diese Werte ausreichend für eine zufriedenstellende klinische Wirkung wären. In der pferdemedizinischen Fachliteratur werden andere Herstellungstechniken für mPRP und kommerzieller Methoden beschrieben, welche effektiver sind, um höhere TZ- und GF-Konzentrationen zu erzielen und sollten von den Klinikern in Betracht gezogen werden. Diese Faktoren und die Unterschiede der Blutprodukte sollten vom Anwender beim Einsatz derer beachtet werden.

Interessenskonflikt

Die Autoren erklären, hinsichtlich der in diesem Beitrag erwähnten Pharma- oder Medizintechnikfirmen keinem Interessenskonflikt zu unterliegen.

Danksagungen

Die Autoren danken dem Team des Labors der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig sowie Frau Lochmann für die Mitwirkung. Die Fa. Arthrex GmbH finanzierte die ELLSA-Kits sowie die Blutuntersuchungen und stellte die ACP®-Spritzen zur Verfügung. Die Ergebnisse dieser Studie wurden teilweise bei der IVRMS-Sitzung der World Conference on Regenerative Medicine in Leipzig am 4. November 2011 präsentiert.