

D. Buchwald, D. Reber, C. Kaltschmidt¹,
A. Laczkovics, A. Wiebalck²

Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie,
Berufsgenossenschaftliches Universitäts-
klinikum Bergmannsheil GmbH, Bochum
(Direktor: Prof. Dr. A. Laczkovics)

¹Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld

²Klinik für Anaesthesiologie, Intensiv-,
Palliativ- und Schmerzmedizin,
Berufsgenossenschaftliches Universitäts-
klinikum Bergmannsheil GmbH, Bochum
(Direktor: Prof. Dr. M. Zenz)

Validierung eines Verfahrens zur Herstellung von autologem Thrombozyten-Gel

ZUSAMMENFASSUNG

Thrombozyten spielen nicht nur bei der Hämostase, sondern auch bei der Wundheilung eine wesentliche Rolle. Die in ihnen gespeicherten Wachstumsfaktoren können freigesetzt werden und wirken dann auf Zellen, die an der Wundheilung beteiligt sind. Diesen biologischen Mechanismus kann man gezielt nutzen, indem man Thrombozyten zunächst konzentriert und nachfolgend mit Thrombin aktiviert. Auf eine Wundfläche aufgetragen, kann dieses Konzentrat die Wundheilung stimulieren und dabei helfen, Wundheilungsstörungen zu verhindern oder zu behandeln. Das hier vorgestellte und validierte Verfahren zur Herstellung eines autologen Thrombozyten-Gels kann das Tätigkeitsspektrum interessierter Kardiotechniker sinnvoll ergänzen.

SCHLÜSSELWÖRTER

Plättchenreiches Plasma, PRP, Wachstumsfaktoren, Wundheilung, ANGEL[®]

ABSTRACT

Not only in hemostasis but in wound healing as well thrombocytes play an essential role. They release growth factors which elicit actions on the cells involved in wound healing. This biological mechanism can be exploited specifically by concentrating the thrombocytes and subsequently activating them with thrombin. Spread onto a wound surface, this concentrate stimulates the process of wound healing and can be used to either prevent or therapy wound healing disturbances. The validated method presented here to produce an autologous thrombocyte gel is likely to increase the activity spectrum of interested perfusionists.

KEY WORDS

Platelet-rich plasma, PRP, growth factors, wound healing, ANGEL[®]

EINLEITUNG

Thrombozyten sind mit 1,5 bis 3 µm Durchmesser die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes. Sie enthalten in ihren α-Gra-

nula verschiedene Wachstumsfaktoren, die bei der Wundheilung wichtige Funktionen ausüben. Sie wirken chemotaktisch, erhöhen die Zellmotilität, stimulieren die Proliferation, Neovaskularisierung und die Proteinsynthese. Thrombozyten können durch den Kontakt mit Thrombin aktiviert werden und geben dann nach Umstrukturierung ihres Zytoskeletts die Granula-Inhalte an die extrazelluläre Matrix ab. Dieser als Degranulation bezeichnete Vorgang findet als physiologischer Prozess auf Wundflächen statt. Mit dem Wissen über diese Mechanismen entwickelte sich das Konzept des autologen Thrombozyten-Gels. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sich mit aktivierten Thrombozyten in supraphysiologischen Konzentrationen Wundheilungsprozesse stimulieren lassen [1, 2, 3, 4]. Seitdem kommerziell erhältliche Systeme zur Verfügung stehen, die eine Point-of-Care-Zubereitung von Thrombozyten-Gel aus patienteneigenem Blut ermöglichen, wird dieses Verfahren zunehmend in verschiedenen medizinischen Disziplinen etabliert [5]. Im Rahmen einer Studie wurde in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Bergmannsheil der Effekt von autologem Thrombozyten-Gel auf die Wundheilung am Bein nach offener Saphenektomie untersucht. Die Studie schloss 70 Patienten ein, war prospektiv, blockrandomisiert und von der zuständigen Ethikkommission genehmigt. Dieser Artikel konzentriert sich nicht auf die medizinischen Ergebnisse der Studie, sondern auf die für Kardiotechniker relevanten technischen Aspekte dieser Untersuchung.

TECHNISCHES VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON AUTOLOGEM THROMBOZYTEN-GEL

Das Therapiekonzept besteht darin, native Wachstumsfaktoren aus den Thrombozyten freizusetzen, die dann direkt auf die Wundfläche einwirken. Die Thrombozyten werden dabei aus patienteneigenem Blut durch Zentrifugation isoliert und konzentriert. Der Patient stellt folglich das biochemische Instrumentarium selbst zur Verfügung. Da

es sich um eine autologe Anwendung handelt, ist die Übertragung von Infektionskrankheiten, wie sie bei einer Blutkomponententherapie aus einem Spenderpool möglich ist, ausgeschlossen [6].

Die Herstellung des Gels erfordert mehrere Verarbeitungsschritte, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt sind. Ausgangspunkt ist die Gewinnung des Vollblutes. Insgesamt wurden pro Patient 157 ml Blut in einen Blutleerbeutel mit 23 ml ACD-A-Stabilisator entnommen. Die zentrale Komponente zur Herstellung ist ein teilautomatisiertes Zellseparationsystem (ANGEL[®], Dideco, Italien) (Abb. 2), bestehend aus einem Blutverarbeitungsgerät und verschiedenen sterilen Einmalprodukten. Das System verarbeitet die zuvor abgenommene Blutmenge und trennt sie in die Hauptbestandteile Erythrozyten, thrombozytenreiches und thrombozytenarmes Plasma auf. Zunächst wird das Vollblut automatisch in eine sich drehende Separationskammer gepumpt. Durch die Zentrifugation werden die Erythrozyten – die schwersten Bestandteile des Blutes – von den leichteren Bestandteilen – dem Plasma und den Thrombozyten – getrennt. Hierfür wird ein Zwei-Phasen-Zentrifugationszyklus durchlaufen, der aus einer harten Zentrifugation mit 4000 U/min für 11 Minuten und einer weichen Zentrifugation von 3000 U/min für 2 Minuten besteht. Als erste Fraktion wird nach Abschluss der Zentrifugation plättchenarmes Plasma (Platelet-poor Plasma, PPP) in einen Auffangbeutel gepumpt. Je nach Zusammensetzung des Vollblutes waren dies zwischen 100 und 130 ml PPP. Das danach folgende thrombozytenreiche Plasma (TRP) ist die wichtigste Komponente. Es wird von einem Sensor erkannt und über einen Ventilmechanismus in eine an das Gerät angeschlossene Konzentratspritze gefördert. Das TRP-Volumen betrug ca. 3–5 ml. Hierin sind konzentriert Thrombozyten und Leukozyten enthalten. Als dritte Schicht werden aus der Zentrifugationskammer 50–80 ml Erythrozyten in einen Auffangbeutel gepumpt. Sowohl die Erythrozyten als auch überschüssiges Plas-

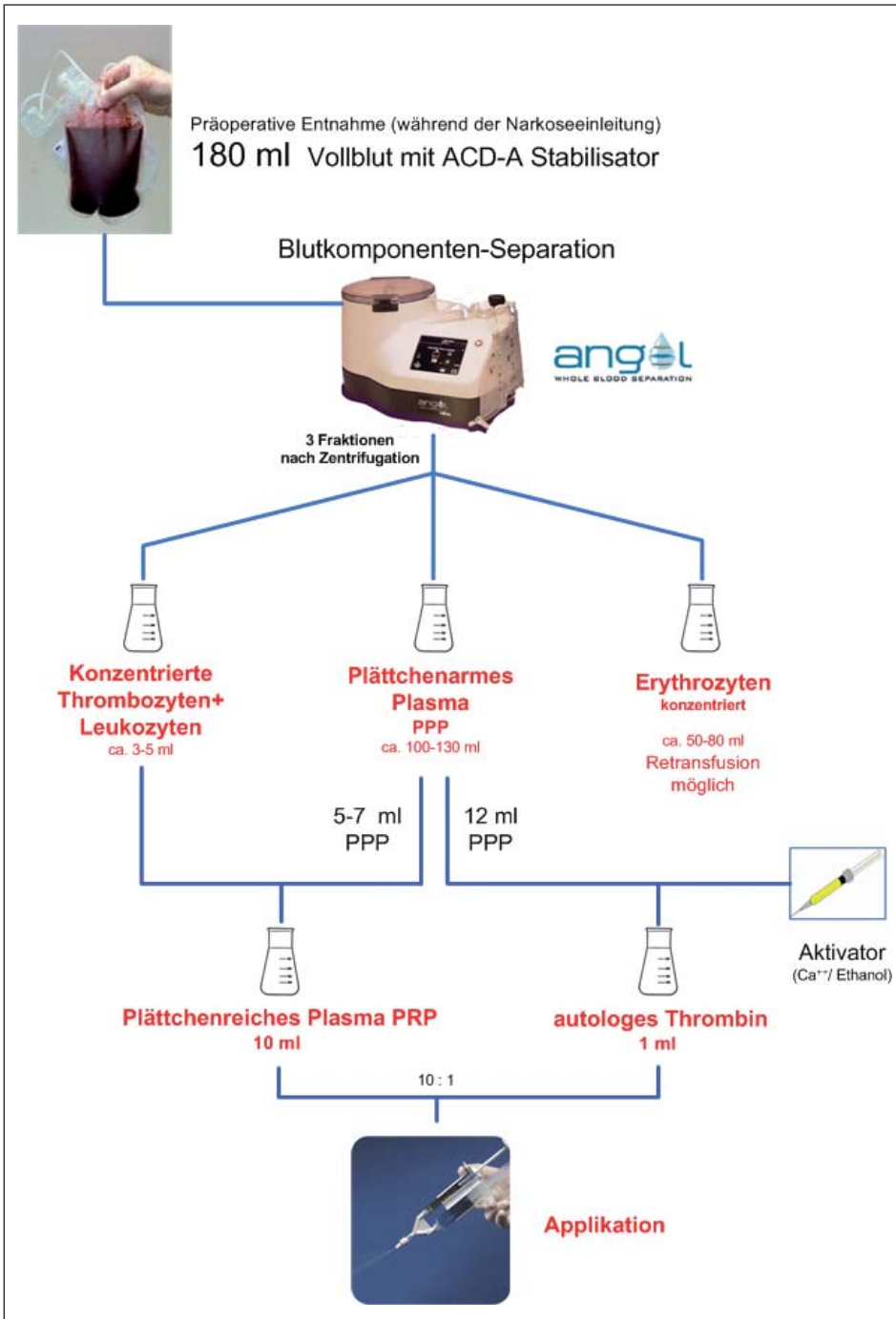


Abb. 1: Prozessablauf zur Gewinnung von autologem Thrombozyten-Gel

ma mussten nicht verworfen werden, sondern konnten zum Priming der Herz-Lungen-Maschine verwendet werden. Für eine sinnvolle Applikation ist das Volumen des gewonnenen TRP zu gering. Daher wird es mit Plasma so weit zurückverdünnt, dass ein Gesamtvolumen von 10 ml vorliegt. Im nächsten Verarbeitungsschritt wird das autologe Thrombin gewonnen, mit dem die Thrombozyten aktiviert werden. Die Serinprotease Thrombin (FIIa) konvertiert am Ende der plasmatischen Gerinnungskaskade das Zymogen Fibrinogen zu unlöslichen Fibrinmonomeren, die dann polymerisieren und ein Fibrinnetzwerk zum Wundverschluss bilden. Thrombin kann aus dem

separierten Plasma gewonnen werden. Zunächst muss dafür durch Zugabe von Kalziumionen eine Rekalzifizierung durchgeführt werden. Anschließend wird die plasmatische Gerinnung durch den Kontakt mit einer Fremdoberfläche (Mikroglasperlen) aktiviert. Es kommt dann zur Bildung eines Fibringerinnsels. Übrig bleibt Blutserum, in dem sich Thrombin befindet. Auf diese Weise ließen sich 3–5 ml Thrombinserum gewinnen, das laut Herstellerangaben eine Aktivität von mindestens 50 Internationalen Einheiten besitzt. Am Ende des Herstellungsprozesses hat man nun zwei Komponenten: thrombozytenreiches Plasma und Thrombin. Werden diese im Verhält-



Abb. 2: Zellseparationsystem ANGEL® (Dideco, Italien)

nis von 10:1 zusammengebracht, kommt es innerhalb weniger Minuten zur Degranulation der Thrombozyten und Freisetzung der Wachstumsfaktoren. In Abbildung 3 ist eine Wundfläche am Unterschenkel erkennbar, auf die autologes Thrombozyten-Gel aufgebracht wurde. Die Gel-Oberfläche ist glänzend und bedeckt Epidermis, Kutis und Subkutis.



Abb. 3: Wundfläche am Bein nach Applikation von TRP und Thrombin. Das Thrombozyten-Gel hat die Wundfläche vollständig benetzt.

PARAMETER ZUR BEURTEILUNG DES HERSTELLUNGSPROZESSES

Zur Beurteilung der Effizienz des Herstellungsprozesses wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und auf folgende Parameter untersucht:

- Probe P0: Thrombozytenzahl $n_{T,V}$, Leukozytenzahl $n_{L,V}$ im Vollblut
- Probe P1: Thrombozytenzahl $n_{T,TRP}$, Leukozytenzahl $n_{L,TRP}$ im TRP

Aus den Zellzahlen kann dann nach der Formel 1 ein Prozessertrag (Y_T) errechnet werden, der angibt, wie viel Prozent der insgesamt in den 180 ml Vollblut enthaltenen Thrombozyten im TRP konzentriert werden konnten.

$$Y_T = \frac{V_{PRP} \cdot n_{T,TRP}}{V_V \cdot n_{T,V}} \cdot 100 \%$$

Formel 1: Berechnung des Prozessertrages Y_T ; Volumina: $V_{PRP} = 12 \text{ ml}$, $V_V = 180 \text{ ml}$

Des Weiteren wurden die Konzentrationen von zwei charakteristischen Wachstums-

faktoren mit einem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) bestimmt. Platelet Derived Growth Factor AB (PDGF-AB) und Epidermal Growth Factor (EGF) werden von Thrombozyten freigesetzt und spielen bei der kutanen Wundheilung wesentliche Rollen [7]. Die Proben wurden aus dem Vollblut und nach 90-minütiger Aktivierung mit Thrombin aus dem Überstand des TRPs entnommen.

ERGEBNISSE

Insgesamt standen die Proben von $n = 35$ Patienten zur Verfügung. Die genauen Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgelistet. Erwartungsgemäß errechnet sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Thrombozytenzahlen im Vollblut und im rückverdünnten TRP ($p < 0,005$, t-Test für unabhängige Stichproben). Der Aufbereitungsprozess führte rechnerisch zu einer Erhöhung der Thrombozytenzahl um den Faktor $7,1 \pm 2,0$. Ähnlich verhielt es sich mit den Leukozyten, die um den Faktor $4,8 \pm 2,2$ konzentriert wurden.

Der Thrombozytenertrag Y_T lag bei $47,0 \pm 13,2 \%$. Wendet man Formel 1 auf die Leukozytenzahlen an, errechnet sich ein Leukozytenertrag Y_L von $31,8 \pm 14,5 \%$. Basierend auf den Medianwerten ist die PDGF-AB-Konzentration nach der Thrombozytenaktivierung auf das 134fache der Ausgangskonzentration angestiegen. Für EGF errechnet sich aus den Medianwerten ein Konzentrationsanstieg nach Thrombozytenaktivierung auf das 86fache der Ausgangskonzentration.

DISKUSSION

Zur Gewinnung von TRP existieren zahlreiche Methoden, die zwar als Endprodukt plättchenreiches Plasma hervorbringen, deren Zellgehalte und Volumina jedoch erheblich schwanken [8, 9]. Daher lassen sich die genannten Methoden nur schwer vergleichen. Marx [6] empfiehlt, eine Thrombozytenzahl von $1000 \cdot 10^9/l$ als Zielwert anzustreben, da eine Stimulation der Heilung von Knochen und Weichgewebe bei dieser Konzentration wissenschaftlich nachgewiesen sei. Weibrich [10] vergleicht in seiner Studie die Wirkung von PRP in Kombination mit Titanimplantaten im Tiermodell. Er stellt eine statistisch signifikant bessere Knochenregeneration fest, wenn die Thrombozytenzahlen im TRP in einem Bereich von $950 \cdot 10^9/l$ bis $1729 \cdot 10^9/l$ liegen. Während mit niedrigeren Konzentrationen nur ein suboptimaler Effekt erzielt werden kann, vermögen höhere Werte einen paradoxen inhibitorischen Effekt auszulösen.

Parameter	Probe P0 (Vollblut) Mittelwerte ± 1 SD; Median; Spannweite	Probe P1 (TRP) Mittelwerte ± 1 SD; Median; Spannweite
Thrombozytenzahl	$220 \pm 72 \cdot 10^9/l$ $199 \cdot 10^9/l$ $124 \cdot 10^9/l - 484 \cdot 10^9/l$	$1613 \pm 845 \cdot 10^9/l$ $1243 \cdot 10^9/l$ $715 \cdot 10^9/l - 4120 \cdot 10^9/l$
Leukozytenzahl	$5,6 \pm 1,6 \cdot 10^9/l$ $5,2 \cdot 10^9/l$ $2,9 \cdot 10^9/l - 9,8 \cdot 10^9/l$	$26,8 \pm 13,7 \cdot 10^9/l$ $22,3 \cdot 10^9/l$ $8,7 \cdot 10^9/l - 62 \cdot 10^9/l$
PDGF-AB-Konzentration	$4,1 \pm 4,7$ ng/ml 2,6 ng/ml 0,7 ng/ml – 19,5 ng/ml	$394,2 \pm 295,5$ ng/ml 347,3 ng/ml 31,9 ng/ml – 1480 ng/ml
EGF-Konzentration	$16,6 \pm 41,4$ pg/ml 4,0 pg/ml 0,0 pg/ml – 208 pg/ml	$461,3 \pm 417,2$ pg/ml 345,5 pg/ml 62 pg/ml – 1832 pg/ml
Thrombozytenertrag Y_T		$47,0 \pm 13,2 \%$
Thrombozyten-Konzentrationsfaktor		$7,1 \pm 2,0$
Leukozytenertrag Y_L		$31,8 \pm 14,5 \%$
Leukozyten-Konzentrationsfaktor		$4,8 \pm 2,2$

Tab. 1: Messergebnisse und berechnete Kenngrößen

Keyv [8] vergleicht sechs verschiedene Verfahren zur Gewinnung von PRP, er kann jedoch nur bei einem eine mittlere Zellzahl von über $1000 \cdot 10^9/l$ nachweisen. Mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verfahren lagen die Thrombozytenzahlen im Mittel bei $1613 \pm 845 \cdot 10^9/l$ und damit im Soll-Bereich, den Marx in seiner Arbeit empfohlen hat. Als Kenngröße für die Effizienz des Zellseparationsprozesses wurden die Thrombozyten- und Leukozytenerträge Y_T bzw. Y_L definiert. Die berechneten Erträge gestatten den Vergleich verschiedener Herstellungsverfahren, da die Werte auf die verarbeiteten und gewonnenen Volumina normiert sind. Mit dem in der eigenen Kli-

nik angewendeten Verfahren konnten im Mittel 47 % der im Vollblut vorhandenen Thrombozyten im PRP konzentriert werden. Folglich verblieben nach der Zellseparation 53 % der Zellen in der Phase der Erythrozyten. Vergleichbare Verfahren liefern nach Literaturangaben allerdings auch keine höheren Erträge, wie die Gegenüberstellung in Abbildung 4 zeigt. Hier sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Thrombozytenerträge von acht Verfahren aufgeführt. Demzufolge liegt das in der eigenen Klinik verwendete Verfahren in einer Rangliste auf dem 5. Platz.

Alein aus den Zellzahlen lässt sich keine Aussage über den Gehalt an Wachstumsfak-

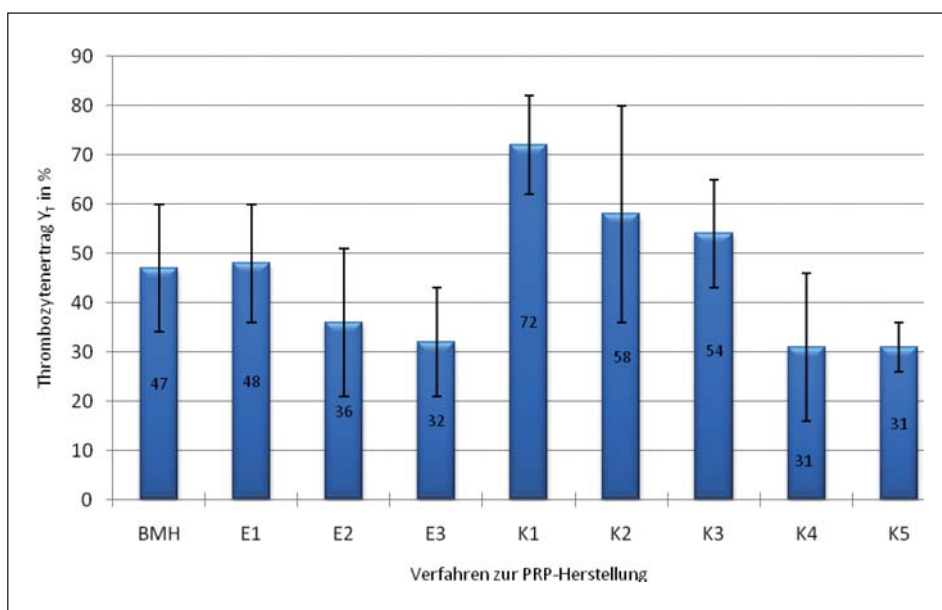


Abb. 4: Thrombozytenerträge (Yield) Y_T : Vergleich des Klinikverfahrens mit 8 Verfahren nach Literaturangaben: Verfahren E1–E3 nach Everts [15], Verfahren K1–K5 nach Keyv [8]; BMH: Universitätsklinikum Bergmannsheil

toren in den α -Granula ableiten. Weibrich [11] konnte in seiner Studie keinen Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl im PRP, dem Alter und Geschlecht der Probanden sowie der Wachstumsfaktorkonzentration finden. Ferner muss berücksichtigt werden, dass über den Grad der Degranulation keine Aussagen gemacht werden können. Die Aktivierung der Thrombozyten ist nicht nur von der Zeit, sondern auch von der Konzentration des Aktivators Thrombin abhängig [12]. Da dessen Aktivität jedoch nicht bekannt ist, liegt hierin eine mögliche Erklärung für die große Streubreite der Ergebnisse. Die gemessenen EGF-Konzentrationen von $461,3 \pm 417,2$ pg/ml korrespondieren gut mit einer Arbeit von Frechette [3], der unmittelbar nach der Aktivierung der Thrombozyten Konzentrationen von 470 ± 130 pg/ml gemessen hat. Mit dem ELISA-Verfahren kann keine Aussage über die Bioaktivität der gemessenen Moleküle gemacht werden. Von PDGF ist bekannt, dass er erst durch den Kontakt mit der thrombozytären Zellmembran während der Degranulation in einen bioaktiven Status überführt wird [13, 14]. Insofern liefern die gemessenen Erhöhungen der PDGF-Konzentration auf das 134fache und der EGF-Konzentration auf das 86fache gegenüber der Plasmakonzentration nur eine Teilinformation über die biologischen Eigenschaften des autologen Thrombozyten-Gels.

Von klinischer Relevanz ist zudem die Handhabung des Systems im OP-Umfeld. Das mit Blut in Kontakt kommende Verbrauchsmaterial (Zentrifugationskammer, Schlauch- und Auffangbeutelssystem) ist steril und pyrogenfrei. Die Verarbeitung des Blutes bis zum fertigen TRP findet in einem geschlossenen System statt, wodurch das Kontaminationsrisiko minimiert wird. Somit verbleibt ein Restrisiko der mikrobiellen Kontamination während der Blutentnahme und der erforderlichen Manipulationen mit dem Spritzensystem

zur Gewinnung des Thrombins. Verglichen mit anderen marktüblichen Geräten sind jedoch deutlich weniger manuelle Teilschritte erforderlich, um autologes, plättchenreiches Plasma und Thrombin zu produzieren. Dem getesteten System kann Anwenderfreundlichkeit und Sicherheit bezüglich der hohen Anforderungen an die Sterilität beim Umgang mit Humanblut testiert werden. Da das Verfahren direkt im OP angewendet werden kann, ergänzt es die ohnehin von Kardiotechnikern bereits praktizierten Blutaufbereitungsverfahren wie Cellsaver und Hämofiltration sinnvoll. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit dem verwendeten, teilautomatisierten Zellseparationssystem Thrombozyten und Leukozyten in hohen Konzentrationen in einem definierten Volumen gewonnen werden können. Die Zellzahlen liegen dabei reproduzierbar in einem Bereich, der in der Literatur als therapeutisch sinnvoll erachtet wird. Die anschließende Aktivierung des plättchenreichen Plasmas mit autologem Thrombin führt zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren in Konzentrationen, die um ein Vielfaches über den physiologischen Werten liegen.

LITERATUR

- [1] Scalfani AP et al: Modulation of wound response and soft tissue ingrowth in synthetic and allogeneic implants with platelet concentrate. [comment] *Arch Facial Plastic Surg* 2005; 7(3): 163–169
- [2] El-Sharkawy H et al: Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol* 2007; 78(4): 661–669
- [3] Frechette JP, Martineau I, Gagnon G: Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res* 2005; 84(5): 434–439
- [4] Mustoe TA et al: Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. *J Clin Invest* 1991; 87(2): 694–703
- [5] Everts PA et al: The use of autologous platelet-leukocyte gels to enhance the healing

process in surgery, a review. *Surg Endosc* 2007; 21 (11): S. 2063–2068

[6] Marx RE: Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001; 10(4): 225–228

[7] Lynch SE et al: Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(21): 7696–7700

[8] Kevy SV, Jacobson MS: Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol* 2004; 36(1): 28–35

[9] Christensen K et al: Autologous platelet gel: an in-vitro analysis of platelet-rich plasma using multiple cycles. *J Extra Corpor Technol* 2006; 38(3): 249–253

[10] Weibrich G et al: Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004; 34(4): 665–671

[11] Weibrich G et al: Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Cranio-maxillofac Surg* 2002; 30(2): 97–102

[12] Kumar V et al: Stability of human thrombin produced from 11 ml of plasma using the thrombin processing device. *J Extra Corpor Technol* 2005; 37(4): 390–395

[13] Harrison P, Cramer EM: Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993; 7(1): 52–62

[14] Pietrzak WS, Eppley BL: Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg* 2005; 16(6): 1043–1054

[15] Everts PA et al: Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors* 2006; 24(3): 165–171

Dipl.-Ing. Dirk Buchwald
Leitender Kardiotechniker
Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie
Berufsgenossenschaftliches Universitäts-
klinikum Bergmannsheil GmbH
Bürkle-de-la-Camp-Platz 1
44789 Bochum
E-Mail: dirk.buchwald@dgfkt.de