

Die Möglichkeit der Herstellung von Plättchenreichem Plasma in verschiedenen Konsistenzen – eine Erweiterung der Therapieoptionen für die Regenerative Medizin in der Orthopädie und Unfallchirurgie

NORBERT LAUBE¹ UND CHRISTOPH WILLE¹

¹ RegenLab SA

Plättchenreiches Plasma, PRP, wird im Praxisalltag zumeist in flüssiger Form angewendet. Aus dem Zentrifugenröhrchen in die Applikationsspritze überführt kann es aufgrund seiner niedrigen Viskosität leicht mit einer dünnen Kanüle, zum Beispiel, in einen von Arthrose betroffenen Gelenkspalt injiziert werden. In diesem relativ abgeschlossenen Hohlraum können die von den Thrombozyten freigesetzten Wirkstoffe die angestrebten Regenerationsprozesse hinreichend lange aktivieren. Um sich die Thrombozyteneffekte auch in einem offenen Situs nutzbar machen zu können, muss die PRP-Viskosität so erhöht werden, dass das PRP ohne Einschränkung des therapeutischen Wirkpotentials über einen längeren Zeitraum hinweg am Ort der Anwendung verbleibt. Im Folgenden wird ein Konzept für die standardisierte Herstellung auch nicht-flüssiger PRP-Produkte beispielhaft erläutert: vom formbaren und zum Beispiel mit Knochenersatzmaterial angereicherten PRP-Gelpfropf zur Auffüllung ossärer Kavitäten bis hin zur dehn-, schneid- und nähbaren autologen PRP-Membran zur Wundbedeckung. Mit dieser Möglichkeit erweitert sich das PRP-Anwendungsspektrum bis weit in die operativen Teilgebiete der Orthopädie und Unfallchirurgie hinein.

EINLEITUNG

Erinnern wir uns: Die Blutzusammensetzung ist komplexer Natur und umfasst u.a. anabol und katabol wirkende zelluläre Bestandteile. In den letzten zwei Dekaden hat sich für viele Krankheitsbilder die Anwendung von Aufreinigungen und Anreicherungen der anabol wirkenden Thrombozyten aus dem Vollblut als autologe Therapieoption etabliert. An den Therapieort reinjiziert soll das sogenannte »Plättchenreiche Plasma« (PRP) an Ort und Stelle die Regeneration anregen oder gestörte Regenerationsprozesse normalisieren. Gerade im Bereich der Orthopädie mit den (chronisch-)degenerativen Erkrankungen wie z.B. Sehnen-Entzündungen [5], der Arthrose [1, 10, 17], bis hin zur rheumatoiden Arthritis [7, 12] werden mit PRP – wenn auch nicht immer in gleichem Maße – positive Wirkungen erzielt [9].

Beim Einsatz von Knochenimplantaten im Rahmen der rekonstruktiven Chirurgie können PRP-Präparate bei der Ausheilung von Hartgewebeverletzungen z.B. durch eine Verbesserung der Osteosynthese/Osteogenese [3, 4] und zur Unterstützung der Durchbauung synthetischer Knochenersatzmaterialien [19], oder zur Verbesserung der Knochen-Implantat-Interaktion [11, 13, 20] eingesetzt werden.

Während zur Therapie von Weichgewebsverletzungen gezielt injizierbare, d.h. **flüssige** niedrig-viskose PRP-Zubereitungen Mittel der Wahl sind, eignen sich für die Behandlung von Hartgewebsschäden PRPs mit **gelartigen** Konsistenzen unterschiedlicher Viskosität und Zähigkeit.

Das ex-vivo passend verfestigte PRP lässt sich dann, z.B. als membranartige Bedeckung leicht auf das zu behandelnde Wundgebiet (z.B. zur Unterstützung der Osteosynthese) positionieren und fixieren. In Verbindung mit der Einbringung von synthetischen Biomaterialien (z.B. Implantate) können die PRP-Gele deren Biokompatibilität erhöhen [16]. Mit zusätzlichen Komponenten (z.B. autologem Knorpel- oder Knochenmaterial) angereichert, werden diese Gele als klebriger Clot, z.B. zur Augmentation von Kavitäten, eingesetzt (**Abb. 2e**).

Neben der einfachen Verbringung und sicheren Fixierbarkeit an „Ort und Stelle“ bieten die nicht-flüssigen PRP-Aufbereitungen weitere Vorteile: zum einen kann ein größeres PRP-Volumen an den Behandlungsort platziert werden und zum anderen, aufgrund der langsamen Diffusion (u.a.) der von den Thrombozyten freigesetzten Wachstumsfaktoren durch die Fibrinmatrix in die Umgebung [2, 18], eine länger andauernde regenerative Wirkung erzielt werden; auch bakteriostatische/antibiotische und damit das Infektionsrisiko senkende Eigenschaften werden diskutiert [6, 14, 15].

GELIFIZIERUNG

Um ein primär flüssiges PRP-Präparat zu gelifizieren, kann die natürliche Eigenschaft des Blutes im Verlauf des Gerinnungsprozesses ein Fibringerüst

auszubilden genutzt werden. Im PRP befinden sich nicht nur die für die primäre/zelluläre Hämostase zuständigen Thrombozyten (Ausbildung eines »vorläufigen« Wundverschlusses), sondern u.a. auch die im Plasma gelösten Fibrinogen-Moleküle (Faktor I), welche am Verletzungsort nach Aktivierung der Reaktionsketten (plasmatische Gerinnung)

- Prothrombin (Faktor II) + Thrombokinase + Ca²⁺ → Thrombin (Faktor IIa)
- Fibrinogen + Thrombin + Ca²⁺ → Fibrinmonomer → Fibrinpolymer

zuerst ein Fibringerinnsel (»fibrin mesh«) und dann, u.a. in Verbindung mit Thrombozyten, letztendlich einen stabilen quervernetzten Thrombus (»cross-

linked fibrin mesh«, sekundäre Hämostase) ausbilden.

CALCIUMGLUCONAT

Wird ein PRP aus einer zuvor z.B. mit Na₃-Citrat adäquat antikoagulierten Vollblutprobe gewonnen (quantitatives Abfangen der im Blut befindlichen Ca²⁺-Ionen, Faktor IV), kann im PRP der Gerinnungsprozess durch die Zugabe z.B. einer geeigneten Calciumgluconat-Lösung reaktiviert bzw. ausgelöst werden. Dieses Vorgehen führt zu einer sehr schnellen, jedoch nicht gänzlich autologen, Gelifizierung unter Ausbildung eines mit thrombozytenhaltigem Serum (dessen Konzentrationsverhältnisse jedoch

Abbildung 1

■ Die Herstellung von leukozytenreduziertem Plättchenreichem Plasma, PRP (Regen PRP®, oben), und autologem Thrombinserum (Regen ATS®, unten), jeweils am Beispiel der RegenLab-Trenngeltechnologie (Regen Lab SA, Schweiz). Der Einsatz einer Na₃-Citrat-Lösung zur reversiblen Antikoagulation bei der PRP-Herstellung erweist sich nicht nur im Praxisalltag als vorteilhaft (u.a. Zeitpuffer). Die Trenngeltechnologie ermöglicht in einem geschlossenen System innerhalb von 10 Minuten die vom Anwendergeschick unabhängige Herstellung der jeweiligen Blutderivate – mit jeweils definierter Zusammensetzung. Durch zufügen von ATS zum flüssigen PRP kann zu jedem Zeitpunkt der Behandlungsprozedur die PRP-Viskosität über einen zähviskos-schwammartigen (»Clot«-) Konsistenz bis hin zu einer »fest-elastischen« Membran gezielt erhöht werden, sogar noch »im letzten Moment« der OP für eine »Aushärtung« direkt am Point-of-Care; ggf. durch abschließendes Beträufeln mit Ca-Gluconat. Durch Kombination von Regen PRP® und Regen ATS® mit autologen und nicht-autologen Materialien, wie z.B. Knorpelpartikel oder synthetischen TCP-basiertem Knochenersatzmaterial, eröffnen sich zahlreiche Einsatzmöglichkeiten in der Orthopädie und Unfallchirurgie. Diese Graphik kann hoch aufgelöst unter »https://cutt.ly/spitzenforschung_orthopaedie« abgerufen werden.

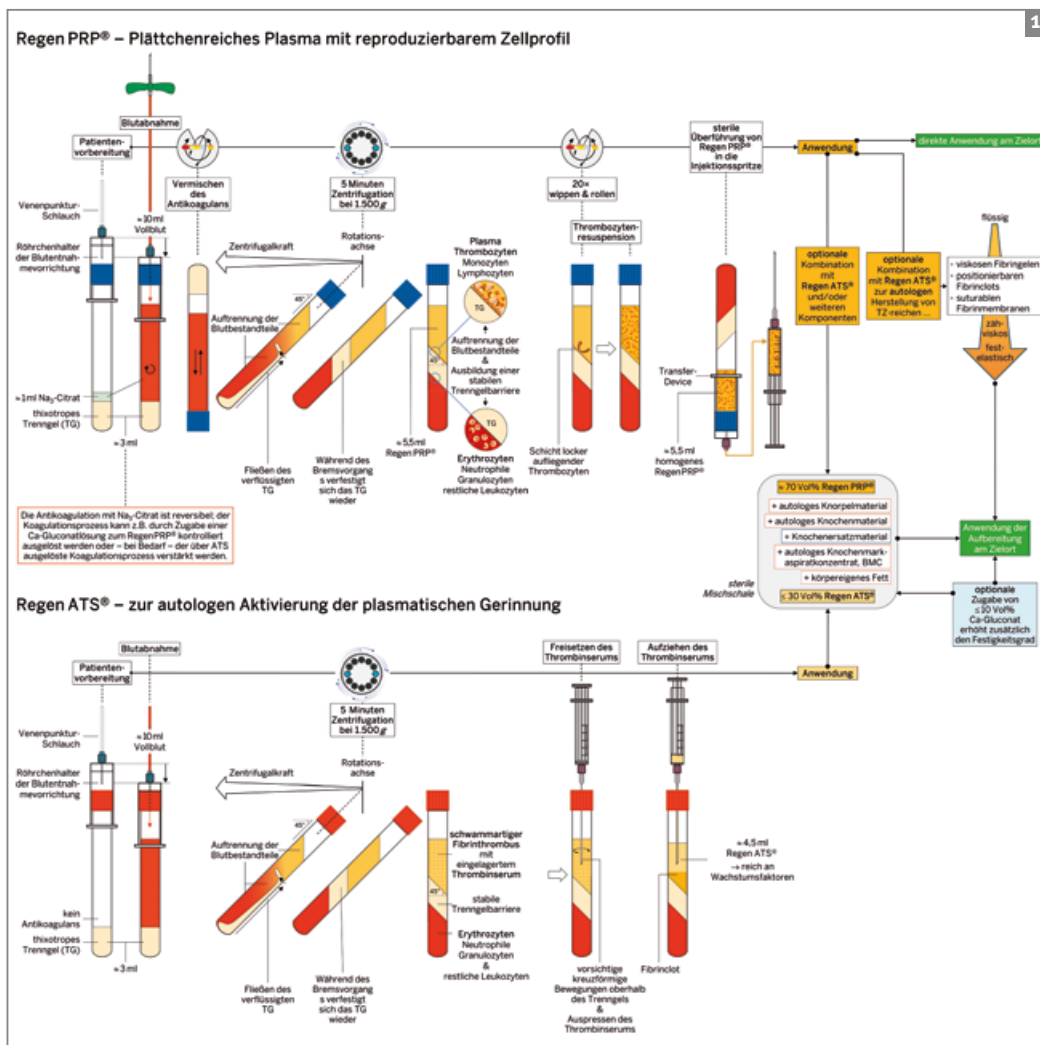


Abbildung 2

■ Die verschiedenen Konsistenzen von plättchenreichem Plasma am Beispiel von Regen PRP®: a) flüssig; b) der nach Zugabe von Regen ATS® gebildete thrombozyten- und serumhaltige Fibrinclot; c) thrombozytenreiche Fibrinmembran nach behutsamen Ausdrücken des Fibrinclots; d) Herstellung eines Gemisches aus Knochenersatzmaterial, Regen PRP® (1), Regen ATS® (2) und ggf. Ca-Gluconat (3) zur finalen »Aushärtung«; e) fertiger, passend form- und zuschneidbarer Clot aus ≈70 Vol% PRP, ≈20 Vol% ATS, ≈10 Vol% Ca-Gluconat und Knochenersatzmaterial.

ggf. durch die Ca-Gluconat-Lösung »verwässert« worden sind) gefüllten schwammartigen und eher »festen« Fibringerüsts.

AUTOLOGES THROMBINSERUM

Alternativ kann ein PRP durch die Zugabe eines zusätzlich hergestellten autologen Thrombinserums (ATS) in eine gelförmige Konsistenz überführt werden (**Abb. 1**). Dabei wandelt das Thrombinserum das im Plasma gelöste Fibrinogen in Fibrinmonomere um, welche wiederum zu einem Koagel polymerisieren (s.o.). In sich in wenigen Minuten bildenden schwammartigen Fibrinnetzwerk befinden sich das aus dem PRP stammende thrombozytenhaltige Serum mit seinen Inhaltsstoffen (u.a. Proteine, Elektrolyte, Nährstoffe, Hormone) und zusätzlich das Serum mit den von den Thrombozyten während der ATS-Herstellung freigesetzten Wachstumsfaktoren. Diese autologe Aufbereitung eines PRP mit physiologischer Zusammensetzung und zäh-viskoser bis fest-elastischer Konsistenz kann als (hauch-)dünne Gelmembran – wenn beide Komponenten voneinander getrennt gleichzeitig auf eine Oberfläche gesprüht werden – oder als Clot mit einem elastischen und tendenziell regelmäßig aufgebauten Fibrinnetzwerk (Zubereitung in steriler Mischschale) aufgebaut werden.

In der Praxis kann ein mit ATS gebildeter Clot bei Bedarf durch Zugabe einer 10% Calciumgluconat-Injektionslösung (≤ 10 Vol%) zusätzlich »ausgehärtet« werden.

Um während des klinischen Eingriffs situativ (»zeitsouverän«) auf die Wirkung des vorbereiteten ATS zurückgreifen zu können, sollte dessen Aktivität

- a) genügend hoch sein, um eine Gelbildung in hinreichend kurzer Zeit sicher zu stellen, und
- b) gleichzeitig über den gesamten Zeitraum der Operation stabil vorhalten.

Bei einer sorgsamen und reproduzierbaren ATS-Herstellungstechnik können diese Forderungen für einen Zeitraum von bis zu vier Stunden nach der Aufbereitung erfüllt werden. Bei beiden genannten Methoden der Gelifizierung muss darauf geachtet werden, dass die jeweiligen Volumina (und ggf. Konzentrationen) der zugegebenen Lösungen so gewählt werden, dass Verdünnungseffekte ausbleiben.

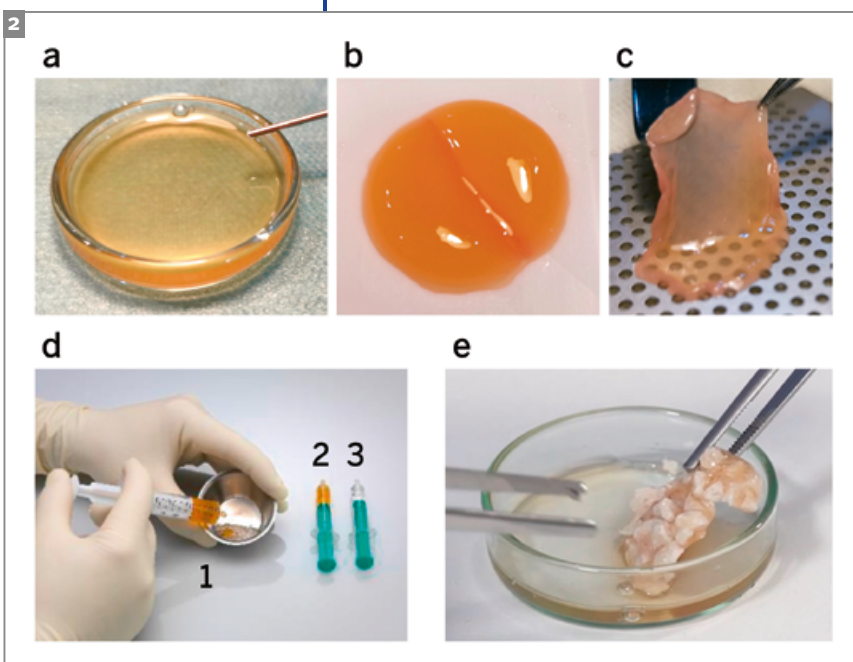
In **Abbildung 2** werden die unterschiedlichen Konsistenzen von PRP+ATS(+Ca-Gluconat)-Aufbereitungen dargestellt.

EXKURS: PRP+ATS VS. PLÄTTCHENREICHES FIBRIN (PRF)

Neben dem oben beschriebenen Ansatz der »PRP-Verfestigung« durch Hinzufügen eines geeigneten Volumens autologem Thrombinserums (ggf. +Ca-Gluconat) zu einem frisch hergestellten plättchenreichen Plasma, besteht eine weitere Methode der Herstellung einer gelartigen Thrombozytenaufbereitung: Die Herstellung von plättchenreichem Fibrin (PRF).

Hier wird die nicht-antikoagulierte Vollblutprobe so zentrifugiert, dass sich a) die Blutbestandteile gemäß ihrer Größe und Dichte voneinander trennen und b) sich am Ende des Aufbereitungsprozesses im Zentrifugenröhrchen ein gelartiger Pfropf bildet. Nach der Entnahme dieses Pfropfes wird die Erythrozytensedimentschicht stumpf abpräpariert und der thrombozytenhaltige Fibrinclot erhalten.

Da sich aufgrund der wirkenden Zentrifugalkräfte die Mehrzahl der Thrombozyten – insbesondere die



jugen und biologisch aktiven (großen) Thrombozyten – bei der PRF-Herstellung auf der Grenzfläche der aus der Vollblutprobe abgeschiedenen Erythrozyten irreversibel auflagern, besteht die Gefahr, dass diese bei der Abtrennung des nicht benötigten Propfanteils dem Patienten verloren gehen. Ein thrombozytenreiches Fibrin ist jedoch bei chirurgischen Eingriffen nicht nur hinsichtlich der Blutgerinnung von Vorteil, sondern auch im Hinblick auf das Freisetzen von Wachstumsfaktoren über einen Zeitraum von bis zu vierzehn Tagen postoperativ [8]. Die im PRF-Fibrinclot verbliebenen (wenigen) Thrombozyten können, den Therapieerfolg zusätzlich schmälern, ungleichmäßig verteilt sein.

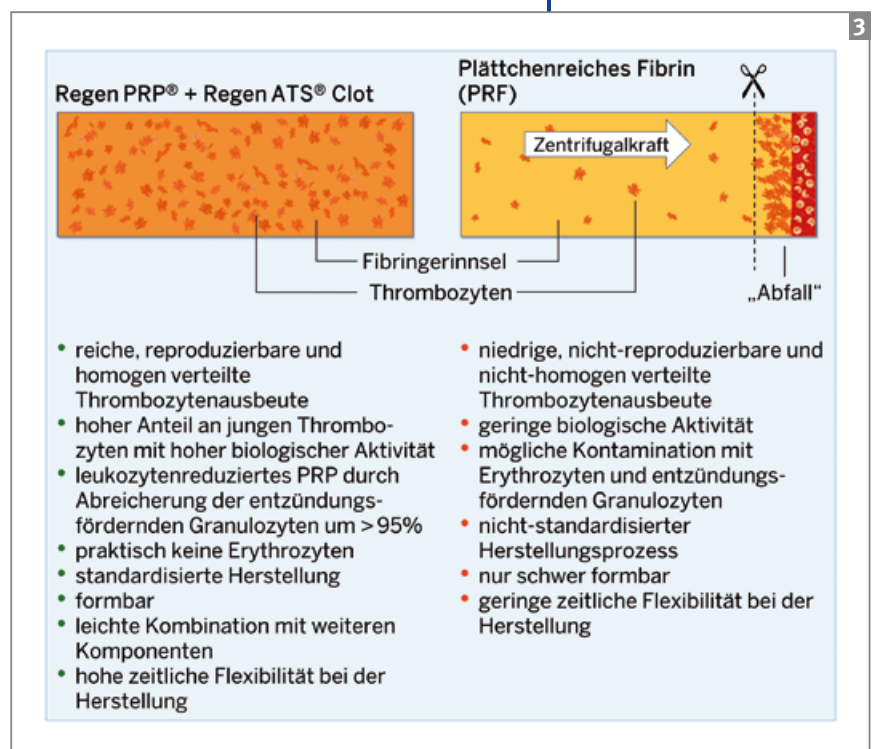
Wie auch bei der PRP+ATS-Kombination, kann der PRF-Propf entweder als serumhaltiger Clot – oder leicht ausgepresst – als Membran eingesetzt werden. Die **Abbildung 3** fasst die Unterschiede beider Herstellungstechniken zusammen.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Beide Präparationstechniken, PRP+ATS und PRF, erzeugen jeweils einen autologen serumhaltigen Clot aus einer 3D-Fibrinmatrix. Herstellungsprinzipbedingt unterscheiden sich die Produkte jedoch u.a. in ihrem Gehalten an Thrombozyten und Leukozyten (**Abb. 3**). Je nach Therapieziel kann sich die Verwendung der Kombination aus PRP+ATS aufgrund der Bereitstellung einer hohen Konzentration an Wachstumsfaktoren bei gleichzeitig niedrigen Konzentrationen an antagonistisch wirkenden entzündungsfördernden Substanzen (= hoher Nettoeffekt der Thrombozytenwirkung) als vorteilhaft erweisen.

LITERATUR

- [1] Abbas A., Du J.T., Dhotar H.S. The effect of leukocyte concentration on platelet-rich plasma injections for knee osteoarthritis: A network meta-analysis. *J Bone Jt Surg.* 2021;104, 559-70.
- [2] Anitua E., Zalduendo M.M., Alkhraisat M.H., et al. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann Anat.* 2013;195(5):461-6.
- [3] Atashi F., Jaconi M.E., Pittet-Cuenod B., et al. Autologous platelet-rich plasma: a biological supplement to enhance adipose-derived mesenchymal stem cell expansion. *Tissue Eng Part C Methods.* 2015;21:253-62.



- [4] Atashi F., Serre Beinier V., Nayernia Z., et al. Platelet rich plasma promotes proliferation of adipose derived mesenchymal stem cells via activation of AKT and Smad2 signaling pathways. *J Stem Cell Res Ther.* 2015;5:301.
- [5] Brancato S.K., Albina J.E. Wound macrophages as key regulators of repair: Origin, phenotype, and function. *Am J Pathol.* 2011;178:19-25.
- [6] Cetinkaya R.A., Yilmaz S., Ünlü A., et al. The efficacy of platelet-rich plasma gel in MRSA-related surgical wound infection treatment: an experimental study in an animal model. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2018;44(6):859-67.
- [7] Chellamuthu G., Muthu S., Khanna M., et al. "Platelet-rich plasma holds promise in management of rheumatoid arthritis"-systematic review. *Rheumatol Int.* 2021 Nov;41(11):1895-903.
- [8] Dohan Ehrenfest D.M., de Peppo G.M., Doglioli P., et al. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors.* 2009;27(1):63-9.
- [9] Gomri F., Vischer S., Turzi A., et al. Swiss medical devices for autologous regenerative medicine: From innovation to clinical validation. *Pharmaceutics.* 2022;14(8):1617. <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/8/1617>
- [10] Hong M., Cheng C., Sun X., et al. Efficacy and safety of intra-articular platelet-rich plasma in osteoarthritis knee:

Abbildung 3

■ Schematische Zusammenfassung der wichtigsten herstellungsbedingten Unterschiede zwischen einem aus PRP+ATS (links; und Abb. 1) und einem mit der PRF-Technik (rechts) erzeugten Fibrinclot.



■ *Norbert Laube*



■ *Christoph Wille*

A systematic review and meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2021;2021:2191926.

- [11] Marx R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489-96.
- [12] Moeda F, Melo X., Hatia M., et al. The effects of intra-articular platelet-rich plasma injections in rheumatoid arthritis: A narrative review. *Cureus.* 2022;14(8):e28182. doi:10.7759/cureus.28182.
- [13] Pieri F, Lucarelli E., Corinaldesi G., et al. Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol.* 2008;35:539-46.
- [14] Smith O.J., Wicaksana A., Davidson D., et al. An evaluation of the bacteriostatic effect of platelet-rich plasma. *Int Wound J.* 2021;18(4):448-56.
- [15] Tang R., Wang S., Yang J., et al. Application of platelet-rich plasma in traumatic bone infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2021;19(7):867-75.
- [16] Traini T., Isaia B., Isaia F., et al. The effects of the combined use of platelet-rich plasma and xenograft on alveolar socket healing. *Biomed J Sci & Tech Res.* 2018;3(1). <https://biomedres.us/pdfs/BJSTR.MS.ID.000847.pdf>
- [17] Vilchez-Cavazos F., Blázquez-Saldaña J., Gamboa-Alonso A.A., et al. The use of platelet-rich plasma in studies with early knee osteoarthritis versus advanced stages of the disease: a systematic review and meta-analysis of 31 randomized clinical trials. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2022. doi: 10.1007/s00402-021-04304-1. Epub ahead of print.
- [18] Wang X., Fok M.R., Pelekos G., et al. In vitro and ex vivo kinetic release profile of growth factors and cytokines from leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) preparations. *Cells.* 2022;11(13):2089.
- [19] Yang J., Zhang X., Liang W., et al. Efficacy of adjuvant treatment for fracture nonunion/delayed union: a network meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Musculoskelet Disord.* 2022;23(1):481.
- [20] Yun J.H., Han S.H., Choi S.H., et al. Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on bone regeneration for osseointegration of dental implants: preliminary study in canine three-wall intrabony defect. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014;102:1021-30.

KONTAKT



Dr. rer. nat. habil. Norbert Laube
 Regen Lab SA
 En Budron B2
 1052 Le Mont-sur-Lausanne, Schweiz
 E-Mail: sekretariat@regenlab.com
 www.regenlab.com