



Zusammenfassung

Hintergrund: Ziel dieser Arbeit waren die Charakterisierung und Optimierung eines kommerziell verfügbaren PRP-Kits. Zusätzlich wurde der Einfluss von leukozytenarmen PRP auf die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe (ASCs) untersucht.

Material und Methoden: Autologes konditioniertes Plasma (ACP) wurde mit drei verschiedenen Zentrifugationseinstellungen von 30 männlichen Probanden (Alter 21–50 Jahre) hergestellt und anhand des Blutbilds und eines Wachstumsfaktorprofils charakterisiert. In einem autologen Zellkulturmodell mit ASCs von vier Patienten wurde der Einfluss von ACP als Medienzusatz auf den Zellzyklus nach 48 Stunden Inkubation mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Ergebnisse: Unabhängig von den Zentrifugationseinstellungen wurden Thrombozyten signifikant im Vergleich zu venösem Blut angereichert ($P < 0,01$), Erythrozyten und Leukozyten wurden signifikant reduziert ($P < 0,01$). Durch Deaktivierung der Bremse bei gleicher Geschwindigkeit der Zentrifuge wurde die Anzahl der weißen Blutkörperchen im Vergleich zur Standardeinstellung weiter reduziert ($P < 0,05$). Die Zellzyklusanalyse zeigte einen höheren prozentualen Anteil von Zellen in der S-Phase unter Einwirkung von 20% ACP im Vergleich zu 10% ACP und 20% Fetales Rinderserum (FCS).

Schlussfolgerungen: Bereits geringfügige Einstellungsänderungen der Zentrifuge bei der ACP-Herstellung beeinflussen die Zusammensetzung des Produkts. Durch Deaktivierung der Bremse bei gleicher Geschwindigkeit der Zentrifuge konnte eine weitere Reduktion der weißen Blutkörperchen erreicht werden. Es existiert ein dosisabhängiger, proliferationsfördernder Effekt von leukozyten-armen ACP auf ASCs.

Schlüsselwörter

PRP – mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe – Zellzyklus – Wachstumsfaktor – weiße Blutzellen

S. Lang et al.

Modification of centrifugation for reduction of leukocyte count in Platelet-rich Plasma and the effect on the proliferation of autologous adipose-tissue derived mesenchymal stem cells

ORIGINAL PAPER

Modifikation der Zentrifugation zur Reduktion der Leukozytenzahl in Platelet-rich Plasma und die Auswirkung auf die Proliferation von autologen mesenchymalen Stammzellen[☆]

Siegmund Lang^a, Gero Brockhoff^b, Boyko Gueorguiev^c, Michaela Huber^d, Johannes Zellner^a, Peter Angele^a, Lukas Prantl^d, Michael Nerlich^a, Sebastian Gehmert^{d,e}, Markus Loibl^a

^aKlinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Regensburg

^bKlinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Regensburg

^cAO Forschungsinstitut, Davos

^dZentrum für Plastische Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg

^eKlinik und Poliklinik für Orthopädie, Universitätsspital Basel

Eingegangen/submitted: 10.09.2015; überarbeitet/revised: 10.01.2016; akzeptiert/accepted: 01.02.2016
Online verfügbar seit/Available online: 28.02.2016

Einleitung

Die Kombination von Wachstumsfaktoren und Stammzellen in der regenerativen Medizin hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen [6]. Seit über 25 Jahren ist bekannt, dass Thrombozyten bioaktive Proteine, wie Wachstumsfaktoren und Zytokine beinhalten und freisetzen [2,5]. Aus diesem Grund hat die klinische Anwendung von Platelet-rich Plasma (PRP) zur Förderung der Regeneration von muskuloskelettalem Gewebe deutlich zugenommen [3,8,14,15]. Auch die Behandlung mit Stammzellen zur Geweberegeneration ist zunehmend etabliert [12]. Fettgewebe stellt eine Quelle für mesenchymale Stammzellen (ASCs) dar, die mit geringem Aufwand isoliert werden können

und bereits erfolgreich für die Regeneration von muskuloskelettalem Gewebe eingesetzt worden sind [7,10].

Trotz der weitverbreiteten Anwendung von PRP in klinischen Studien ist die Evidenz für die Anwendung von PRP bei muskuloskelettalen Weichteilverletzungen immer noch ungenügend [13]. Die Unterschiede in der PRP-Herstellung könnten unter anderem ein Grund für die Inkonsistenz der Literatur bezüglich des positiven Effekts von PRP sein [4,11]. Vor allem aufgrund der unterschiedlichen Leukozyten-Konzentration erzeugt jede Herstellungsmethode ein anderes biologisches Produkt mit unvorhersehbaren Auswirkungen auf zellulärer Ebene. Es wird vermutet, dass die Reduktion der Leukozyten in PRP zu einem Produkt führt, welches für die Regeneration von Gewebe geeignet

[☆] Preisträgerarbeit Young Investigator Award 2015.

Summary

Background: Clinical application of platelet-rich plasma (PRP) and stem cells has become more and more important in regenerative medicine during the last decade. This study aimed to characterize and optimize a commercially available PRP preparation kit. Moreover, the objective was to evaluate the effect of leukocyte-reduced PRP on the proliferation of adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ASCs).

Materials and Methods: Autologous conditioned plasma (ACP) was obtained by using three different centrifugation settings from 30 male donors (aged 21–50 years) and has been characterized based on a hemogram and a growthfactor profile. The influence of ACP as medium supplement on to ASCs of 4 patients has been analysed in an autologous cell culture setting with the use of flow cytometry after 48 hours of incubation.

Results: Thrombocytes in ACP were with significantly higher amount in comparison to venous blood ($P < 0.01$), whereas erythrocytes, and white blood cells (WBC) were significantly reduced ($P < 0.01$), independent of centrifugation settings. Disabling the brake during centrifugation further reduced significantly the number of WBCs in comparison to the standard settings ($P < 0.05$). Cell cycle analysis demonstrated a higher percentage of cells in the S-phase in the presence of 20% ACP in comparison to 10% ACP and 20% Fetal calf serum (FCS), which advocates the proliferation stimulation of ASCs.

Conclusion: Minimal changes in the centrifugation process during ACP preparation significantly influence the composition of the product. Deactivation of the brake during centrifugation further reduced the WBC count. A dose-dependent stimulation of proliferation of leukocyte-reduced PRP on ASCs may be suspected.

Keywords

PRP– mesenchymal adipose-tissue derived stem cells– cell cycle– growthfactor– leukocytes

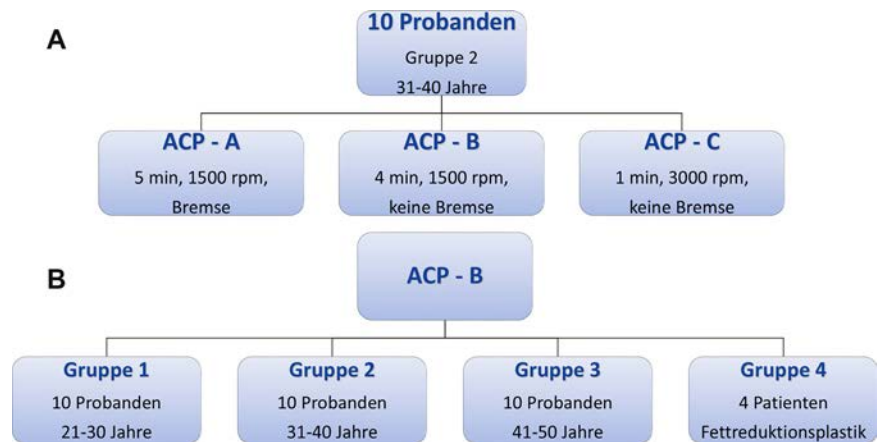


Abbildung 1

A: ACP Zentrifugationsmethoden. **B:** ACP von den Probanden der Gruppen 1–4 wurde durch die Zentrifugationsmethode ACP-B gewonnen.

ist und gleichzeitig die Ausbildung von Narbengewebe reduziert [9]. Ziel der vorliegenden Studie war es ein kommerziell erhältliches PRP Kit (Arthrex Double Syringe, Arthrex, Inc., Naples, Florida, USA) hinsichtlich der biologischen Zusammensetzung zu charakterisieren und die Zentrifugationseinstellungen so zu modifizieren (Geschwindigkeit, Dauer und Bremseneinstellung), um die Leukozytenkonzentration zu reduzieren. Außerdem konnte der Effekt von Leukozyten-reduziertem autologes konditioniertes Plasma (ACP) auf die Zellzyklus-Kinetik von autologen ASCs untersucht werden.

Material und Methoden

30 gesunde, männliche Probanden sowie 4 Patienten, die sich einer Fettreduktionsplastik unterzogen haben, wurden in die Studie eingeschlossen. Die Probanden wurden gleichmäßig in drei Altersgruppen (jeweils $n = 10$) aufgeteilt: 21–30 Jahre (Gruppe 1), 31–40 Jahre (Gruppe 2) und 41–50 Jahre (Gruppe 3). Die vier Patienten mit Fettreduktionsplastik bilden die Gruppe 4 (Abb. 1B).

Venöses Blut wurde direkt in die Arthrex Double Syringe (Arthrex, Inc., Naples, Florida, USA) aufgenommen, um ACP herzustellen. Zusätzlich wurden 2 ml venöses Blut für die Bestimmung des Blutbildes im EDTA-Röhrchen abgenommen. ACP wurde aus venösem Blut der Probanden aus Gruppe 2 mit drei verschiedenen Single-spin-Zentrifugationsmethoden (Zentrifuge: Hettich Rotofix 32a) hergestellt. Von jedem Probanden wurden drei Proben wie folgt zentrifugiert: 1500 rpm für 5 min und aktivierter Bremse (ACP-A); 1500 rpm für 4 min und deaktivierter Bremse (ACP-B); 3000 rpm für 1 min und deaktivierter Bremse (ACP-C) (Abb. 1A). Das Blut der Probanden aus den Gruppen 1 und 3 sowie das Blut der Patienten aus Gruppe 4 wurde mit der Einstellung ACP-B-prozessiert (Abb. 1B). Die Konzentration der Wachstumsfaktoren hFGF, hHGF, hVEGF und hPDGF wurde mittels ELISA (Q-Plex Kit Quansys Bioscience) in ACP und im Serum bestimmt. Diese Wachstumsfaktoren wurden aufgrund ihres Einflusses bei der Wundheilung und der Geweberegeneration ausgewählt [1].

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/2740078>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/2740078>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)