

Plättchenlysat (PL) aus Thrombozytenkonzentraten als pharmazeutischer Hilfsstoff im Sinne einer optimierten Verwendung von Blutprodukten

Zusammenfassung

Mit zunehmendem Einsatz der Arzneimittel für neuartige Therapien (ATMP, advanced therapy medicinal product) und innovativer Zelltherapeutika, wächst der Bedarf an xenogenfreien Kulturmedien. Quarantänefreies Plättchenlysat (PL), das aus Thrombozytenkonzentraten 0 bis 3 Tage nach deren Laufzeit hergestellt wird, bietet eine sehr gute und in doppeltem Sinne „humane“ Alternative zum (fetalen) Kälberserum (FBS bzw. BS). Wir beschreiben hier die Herstellung und weitere mögliche Einsatzgebiete des PL.

Summary

Emerging production of advanced therapy medicinal product (ATMP) and innovative cellular therapeutics goes along with higher and urgent need for xenogen-free culturing media. Quarantine free platelet lysate (PL) derived from expired thrombocyte concentrates provides a very good and human(e) alternative to (fetal) bovine serum (FBS or BS, respectively). We describe the production and further possible applications of PL.

EINLEITUNG

Für die *in vitro* Kultivierung von Zelllinien wird dem Nährmedium in der Regel tierisches Serum als Supplement zugesetzt. Das am häufigsten verwendete Serum ist das fetale bovine Serum (FBS) gefolgt von bovinem Serum (BS). Das tierische Serum dient hierbei als Quelle für Wachstumsfaktoren und Zytokine, die für das Überleben und die Proliferation der Zellen notwendig sind. Wachstumsfaktoren und Zytokine werden im Rahmen der Gerinnung des Vollblutes und der damit verbundenen Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten (insbesondere Granulozyten) freigesetzt.

Folgende Aspekte haben in den letzten Jahren zunehmend dazu geführt, dass für die Kultivierung und Expansion von Zellen, die für den klinischen Einsatz vorgesehen sind, die Verwendung von tierischen Sera nicht mehr befürwortet wird:

1. Übertragung von (neuen) Infektionserregern von Tier auf Mensch.
2. Fehlende Möglichkeit zur Quarantänelagerung der tierischen Seren und der damit verbundenen Nachtestung der Spendertiere, da im Rahmen der Gewinnung des Serums das Spendertier/-fetus stirbt.
3. Ethische Aspekte bei der Gewinnung des tierischen Serums.

4. Unterschiede in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung des tierischen Serums im Vergleich zum menschlichen, was dazu führt, dass *ex vivo* kultivierte Zellen Eigenschaften annehmen könnten, die sie nach der klinischen Anwendung *in vivo* verlieren.
5. Kontakt mit xenogenem Material und somit eine potentielle Veränderung der Eigenschaft von ATMP, z.B. durch Präsentation von xenogenen Antigenen durch das Kulturverfahren auf den zur Anwendung am Menschen kultivierten Zellen

Menschliches Serum als „optimale“ Alternative zum tierischen ist allerdings mit dem Problem verbunden, dass bei der Gewinnung des Serums die restlichen Bestandteile des gespendeten Vollblutes nicht mehr für die Weiterverarbeitung zur Verfügung stehen, da die Aktivierung der Gerinnung mit folgender Verklumpung zellulärer Komponenten des Vollblutes die Voraussetzung für die Gewinnung des Serums „off-the-clot“ ist. Dieser Umstand bedingt, dass nur bei einem Teil der Blutspender (in der Regel Spender mit der Blutgruppe AB) das gespendete Vollblut zum Serum verarbeitet werden kann, um die reguläre Versorgung mit Blutprodukten (Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate) nicht zu gefährden. Das Plasma als FFP (fresh frozen plasma) oder das rekalkifizierte Plasma bieten ebenfalls keine gute Alternative, da der Gehalt an Wachstumsfaktoren und Zytokinen im Plasma deutlich geringer ist als im Serum.

Plättchenlysat (PL) hingegen beinhaltet eine Vielfalt an Zytokinen mit teilweise hohen Konzentrationen¹⁻⁴. Da das PL in der Regel aus abgelaufenen Thrombozytenkonzentraten hergestellt wird, wird hierdurch auch der Forderung nach maximaler und optimaler Nutzung des gespendeten Blutes Rechnung getragen, ohne dass es zu einer Beeinflussung der Grundversorgung kommt.

HERSTELLUNG VON PL

Zur Herstellung des PL werden Thrombozytenkonzentrate 0 bis 3 Tage nach Ablauf ihrer Haltbarkeit zunächst tiefgefroren. Durch den anschließenden Auftauvorgang kommt es zur Lyse der meisten Blutplättchen, die mit einer Freisetzung intrazellulärer Wachstumsfaktoren, Zytokine und Kalzium einhergeht². Das freigesetzte Kalzium bindet einen Teil des Zitrats, das sich als Antikoagulant im Produkt befindet, und aktiviert somit die Gerinnungskaskade, die zur Verklumpung noch nicht lysierter Thrombozyten und der konsekutiven Freisetzung weiterer Wachstumsfaktoren und Zytokine führt. Allerdings läuft die Gerinnungskaskade nicht vollständig ab, so dass man bei späteren Einfrier-/Auftauvorgängen des PL weiterhin die Bildung von Präzipitaten beobachten kann. Die Präzipitate stören nicht bei der Kultivierung von Zellen – es gibt Hinweise, dass Kryopräzipitate sogar eher einen positiven Einfluss auf die Kultivierung von primären Zellen haben könnten – allerdings können sie die Konsistenz des Nährmediums derart ändern, dass die Ernte der kultivierten Zellen erschwert ist. Aus diesem Grund wird dem PL im Rahmen des Wiederauftauens jedesmal so viel Heparin zugesetzt, dass sich eine finale Konzentration von

1 IU Heparin/ml PL-versetztem Nährmedium ergibt.

Weitere Schritte, die im Rahmen der Herstellung zur „Veredelung“ des PL eingesetzt werden, sind:

1. Bestrahlung der Thrombozytenkonzentrate vor dem Einfrieren, um sicherzustellen, dass sich keine teilungsfähigen Lymphozyten im Endprodukt (PL) befinden
2. Filtration zum Entfernen der im Rahmen der Gerinnung entstandenen Verklumpungen
3. Sterilfiltration³
4. Quarantänelagerung der eingefrorenen Präparate und Nachtestung der Blutspender frühestens vier Monate nach der Spende, die zur Herstellung des jeweiligen Thrombozytenkonzentrats geführt hat in Analogie zur Quarantänelagerung von Plasmen

In der Regel wird eine Charge des PL als Pool-PL aus bis zu 100 Einzelspendern (dies entspricht 25 Pool-Thrombozytenkonzentraten) hergestellt, um individuelle Schwankungen des Zytokingehalts bei den einzelnen PL auszugleichen und so eine bessere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen PL-Chargen zu erzielen²⁻⁴.

IDENTIFIZIERUNG DER ESSENTIELLEN KOMPONENTEN:

Das so hergestellte PL enthält zahlreiche verschiedene Faktoren (**Tabelle 1**), von denen bekannt ist, dass sie z. B. das Wachstum von MSC begünstigen. Daher wurde das Wachstum von MSC als Messparameter für die Identifizierung der essentiellen Komponenten des PL verwendet.

Durch Inhibition der Wirkung von PDGF (platelet derived growth factor), FGF-2 (b-FGF, fibroblast growth factor 2) sowie TGFbeta (transforming growth factor beta) mit inhibierenden Antikörpern bzw. Zusatz dieser Faktoren – einzeln oder in Kombination zu Medien – konnte gezeigt werden, dass diese drei Faktoren essentiell, jedoch nicht ausreichend für die wachstumsvermittelnde Wirkung des PL sind^{2,3}. Offensichtlich befinden sich im PL noch weitere, bisher noch nicht näher charakterisierbare Faktoren, die im Zusammenspiel mit PDGF, FGF-2

Pool- und Filtrationsvorgangs des PL im geschlossenen System

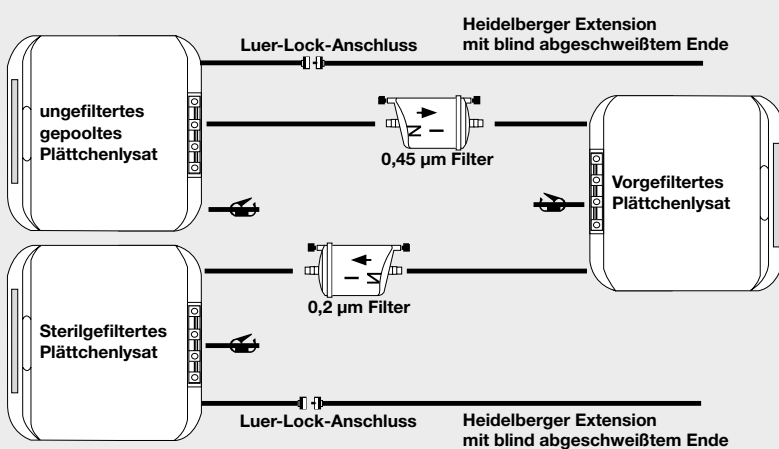


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Pool- und Filtrationsvorgangs des PL im geschlossenen System im IKT Ulm

und TGFbeta die Proliferation von MSC positiv beeinflussen. Daher ist der Ersatz von PL durch eine chemisch definierte Mischung von Wachstumsfaktoren bisher nicht möglich.

Wie wir für das am IKT Ulm hergestellte PL zeigen konnten, besteht nur eine sehr geringe Chargenvariabilität hinsichtlich der oben beschriebenen drei essentiellen Komponenten des PL.

EINSATZMÖGLICHKEITEN:

1. Einsatz bei der Herstellung von ATMP

Routinemäßig wird – neben menschlichem Serum und FBS – PL als Mediumsupplement hauptsächlich zur Kultivierung und Expansion von mesenchyma-

len Stromazellen (MSCs) eingesetzt^{1,2,4}, während für andere Zelllinien der Ersatz des FBS durch PL derzeit sehr aktiv überprüft wird, da für alle Zelllinien, die für einen späteren klinischen Einsatz vorgesehen/geplant sind, die Exposition gegenüber xenogenen Substanzen (wie FBS) vermieden werden soll. Somit etablieren derzeit einige Zellbanken bereits Zelllinien, die von Beginn an in xenogenfreien Medien kultiviert wurden.

2. Trägermatrices für ATMP

Die Fähigkeit des PL zur Gelbildung nach dem Auftauen bietet die Möglichkeit einer 3D-Kultivierung von Zellen sowie einfacheren Transports von Zellen⁵, die sich in Kultur befinden. In PL-Gel eingebettete Zellen können zudem auch sehr gut bei lokaler Anwendung platziert werden, was zudem gewährleistet, dass applizierte Zellen eine gewisse Zeit am Applikationsort verbleiben.

3. Migration von Zellen zum Ort der Anwendung

Für Chemotaxisassays werden inzwischen unterschiedlich vernetztes PL kommerziell angeboten, wobei der Vernetzungsgrad durch den Zusatz von aktiviertem Fibrin erreicht wird.

4. Behandlung der Arthrose des Kniegelenks

Plättchenreiches Plasma wird seit einiger Zeit im Rahmen der „Eigenblutbehandlung“ zur Behandlung osteoartikulärer Defekte^{6,7} wie z.B. Arthrose des Kniegelenks eingesetzt. PL wird als effektivere Behandlungsalternative in den USA und Australien für diese Anwendung bereits kommerziell angeboten. Klar definiertes PL aus quarantäne-

Inhaltsstoff	Konzentration in pg/ml*	Inhaltsstoff	Konzentration in pg/ml*
G-CSF	74	MIP-1 α	47
GM-CSF	34	MIP-1 β	51
INF γ	14	sCD40L	29738**
TNF α	8	sVCAM-1	1789695**
IL-1 α	41	sICAM-1	137300**
IL-1 β	3	bFGF	495
IL-2	0	TGF-b1	139029
IL-6	3	PDGF-AA	239412**
IL-7	32	PDGF-AB/BB	571730**
IL-8	80	RANTES/CCL5	2705600**
IL-10	3	CXCL 1/2/3 (GRO)	11126
VEGF	325		

Inhaltsstoff	Konzentration in g/l***
Gesamtprotein	26
Albumin	16

Tabelle 1: Identifizierte Zytokine und Wachstumsfaktoren im PL

* Mittelwert aus 3 Chargen, ** Mittelwerte aus 9 Chargen,

*** Mittelwerte aus 13 Chargen

Die Autoren



Prof. Dr. med. Ramin Lotfi
Universitätsklinikum Ulm
Institut für Klinische Transfusionsmedizin und
Immungenetik (IKT) Ulm gemeinnützige GmbH
r.lotfi@blutspende.de



Dr. rer. medic. Markus Thomas Rojewski
DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg
– Hessen gemeinnützige GmbH,
Universitätsklinikum Ulm
Institut für Klinische Transfusionsmedizin und
Immungenetik (IKT) Ulm
markus.rojewski@uni-ulm.de

Die Literaturhinweise zu diesem Artikel finden Sie im Internet zum Download unter: www.drk-haemotherapie.de

gelagerten Thrombozytenkonzentraten mit geringen Schwankungen im Gehalt der enthaltenen Faktoren könnte hierzu eine besser definierte, kostengünstige Alternative darstellen. Für diese Anwendung wird der eindeutige Nachweis der Wirksamkeit jedoch noch kontrovers diskutiert.

5. Gele und Auflagen zur Wundheilung

Da das Plättchenlysat reich an Wachstumsfaktoren und Zytokinen ist, die zur Wundheilung und Immunsuppression nötig sind², ist es denkbar, dass sein topischer Einsatz mit einem positiven Effekt hinsichtlich Förderung der Wundheilung verbunden sein könnte.

6. Gewebe-/Organbanken

Die überwiegende Mehrheit der Augenhornhautbanken verwenden derzeit noch FBS als Mediumsupplement. Auch hier ist zu überprüfen, ob FBS durch PL (oder humanes Serum) ersetzt werden kann, wobei insofern Vorsicht geboten ist, als sich hohe Konzentrationen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie FGF-2, PDGF, Insulin-Like-Growth-Factor (IGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), im PL befinden, die nach der Transplantation zu einer Einwanderung neuer Gefäßstrukturen in Richtung des Transplantats führen

Dr. med. Markus M. Müller, Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Erhard Seifried

Neues aus der Rubrik „Was tun wir bei ...?“

Prophylaxe einer Transfusions-assoziierten Graft-versus-Host-Erkrankung (ta-GvHD) durch Bestrahlung zellulärer Blutpräparate vor Transfusion

Zusammenfassung

Die Bestrahlung zellulärer Blutprodukte, also vor allem von Erythrozytenkonzentraten (EK) und Thrombozytenkonzentraten (TK), mit 30 Gray dient der Prophylaxe einer Transfusions-assoziierten Graft-versus-Host-Erkrankung (ta-GvHD) bei immuninkompetenten Transfusionsempfängern. Wenn diese Transfusionsnebenwirkung auch auf Einzelfälle beschränkt ist, so ist ihr letaler Ausgang doch Grund genug, diese einfache Prophylaxe vor Transfusion durchzuführen.

Die Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasma-derivaten der Bundesärztekammer führen die Indikationen zur Bestrahlung zellulärer Blutkomponenten detailliert auf. Allerdings ergeben sich in der praktischen Umsetzung der Leitlinien-Inhalte immer wieder Fragen und Probleme, die der vorliegende Beitrag adressiert. So ist unter anderem die Logistik bestrahlter Blutpräparate, die für einen individuellen Patienten auf Anforderung hergestellt werden, für einige kleinere Krankenhäuser problembeladen. Auch der Zeitraum, über welchen zelluläre Blutpräparate bei den einzelnen Erkrankungen bestrahlt werden sollten, ist für einzelne Indikationen in manchen Häusern nicht oder nicht korrekt festgelegt. Schließlich führen auch die Querschnitts-Leitlinien Krankheitsentitäten auf, bei denen die Evidenz für oder gegen eine Bestrahlung zellulärer Blutpräparate nicht ausreichend ist. Hier muss lokal entschieden werden.

Die Autoren stellen die Bestrahlungsindikationen ihres Universitätsklinikums als ein mögliches Beispiel vor, wie die genannten Fragen beantwortet werden können. Diese Bestrahlungsindikationen wurden 2009 durch eine Expertengruppe des Universitätsklinikums Frankfurt erarbeitet und im Dezember 2009 durch die Transfusionskommission verabschiedet. Es ist wichtig, die jeweiligen Bedingungen „vor Ort“ zu berücksichtigen.

Summary

Irradiation of cellular blood components, mainly packed red blood cell concentrates (RBC) and platelet concentrates (PC), using γ irradiation with 30 Gy, prevents transfusion-associated Graft-versus-Host Disease (ta-GvHD) in severely immunocompromised recipients. Even if extremely rare, the fatal outcome of ta-GvD makes it mandatory to perform this easy form of prophylaxis.

The cross-sectional guidelines for therapy with blood components and plasma derivatives by the German Medical Association specify indications for irradiation of cellular blood components in detail. However, in daily work, questions and problems often arise when one tries to implement the guidelines in a specific hospital. This article tries to answer some of the frequently asked questions. The logistics of irradiated blood components, produced for an individual recipient on request, is problematic for some smaller hospitals. In addition, the time span for treatment with irradiated cellular blood components in specific courses of disease or specific groups of patients is not always or not always correctly defined. The cross-sectional guidelines finally list a number of diseases, for which there is not enough evidence to decide pro or contra irradiation of cellular blood components. Here, a local decision is mandatory.

The authors present the irradiation indications of their university hospital as a potential idea, how to answer these questions. These indications were developed by a group of physicians at the Frankfurt university hospital in 2009. The transfusion commission accepted these indications in December 2009. The local situation has always to be taken into account.