

Терапевтический аферез и диализ 2013; ••(••):•••••

ИЦО: 10.1111/1744-9987.12007 © 2013

Авторы

Терапевтический аферез и диализ © 2013 Международное общество афереза

Первое применение на людях нового модульного фильтра-адсорбера для цитафереза у пациентов с язвенным колитом выраженной активности: пилотное исследование

Вольфганг Рамлоу (Wolfgang Ramlow),¹ Грит Вайц (Grit Waitz),² Гизела Спарманн (Gisela Sparmann),² Генрих Профет (Heinrich Prophet),¹ Пегги Бодаммер (Peggy Bodammer)³ и Йорг Эммрих (Jörg Emmrich)^{3*}

Центр афереза Росток,² компания «БиоАртПродуктс ГмбХ» (BioArtProducts GmbH) и ³ Отделение гастроэнтерологии, Ростокский университет, Росток, Германия

Аннотация: Целью этого исследования была оценка безопасности, переносимости, технических характеристик и клинической эффективности нового модульного фильтр-адсорбера для цитафереза у пациентов с язвенным колитом выраженной активности. Выборку составили 10 пациентов с язвенным колитом (индекс клинической активности 6-10). Новый фильтр-адсорбер (производства компании «Никкисо» (Nikkiso), Токио, Япония) был специально разработан для удаления тромбоцитов, гранулоцитов и моноцитов из периферической крови с использованием экстракорпорального кровообращения. Процедуры цитафереза проводились еженедельно в течение пяти недель (продолжительность каждой - 60 минут). Безопасность и переносимость оценивали путем исследования параметров жизненно важных функций, производственных лабораторных анализов, отчетов о побочных эффектах и анкетирования. Активность заболевания оценивали с помощью клинического индекса активности заболевания, а также эндоскопического индекса Рахмилевича. Технические характеристики и биосовместимость были исследованы путём повторных тестов клеточного состава крови, фактора комплемента С3а и маркеров клеточной поверхности до, во время и после процедур афереза. Процедуры цитафереза переносились пациентами «хорошо» или «очень хорошо». Все измеренные параметры безопасности практически не изменились. Данные по эффективности показали, что количество тромбоцитов, моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов эффективно уменьшалось во время цитафереза. Проведение афереза было связано с высокой частотой ремиссии (80% на 10 неделе). Клиническая ремиссия сопровождалась снижением эндоскопического индекса у 4 из 9 подходящих пациентов. Уровни С3а существенно не повышались во время цитафереза. Новое устройство оказалось безопасным, хорошо переносимым и клинически эффективным. Оно обладало высокой биосовместимостью и эффективным удалением тромбоцитов. **Ключевые слова:** адсорбционный аферез гранулоцитов и моноцитов, воспалительные заболевания кишечника, язвенный колит

Этиология воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) до сих пор полностью не изучена. Основная цель лечения заболевания выраженной активности - достижение и поддержание клинической ремиссии за счёт использования методов лечения с наименьшей вероятностью побочных эффектов.

На сегодняшний день 5-аминосалициловая кислота (5-АСК) и кортикостероиды являются вариантами терапии первого ряда для индукции ремиссии у пациентов с язвенным колитом выраженной активности (ЯК) (1). Кумулятивные высокие дозы или длительное применение стероидов вызывают серьёзные побочные эффекты. Сообщалось также о некоторых случаях резистентности к стероидам. (2).

Многим пациентам проводили колэктомию как последнее средство лечения (3). Адсорбтивный цитаферез был предложен в качестве безстероидного и безопасного метода лечения для достижения ремиссии не только при ВЗК, но и при других иммунологических заболеваниях, таких как ревматоидный артрит и системная красная волчанка (4-6). При сравнении эффективности и безопасности интенсивного адсорбционного афереза гранулоцитов / моноцитов (GMSAP) с интенсивным внутривенным введением преднизолона у пациентов с ЯК тяжёлой формы GMSAP показал лучшие результаты. Более того, реакция на GMSAP была более медленной, но более устойчивой (7).

Несколько рандомизированных контролируемых исследований, проведённых в Японии, продемонстрировали улучшение клинических показателей при лечении аферезом в дополнение к стандартному лечению по сравнению с одним только стандартным лечением (7-9). В отличие от Японии, системы адсорбционного цитафереза в Европе, Северной Америке и большинстве стран мира обычно не

покрываются медицинским страхованием. Это главным образом связано с тем, что стандартное лечение и выбор выходных параметров, использованных в более ранних японских исследованиях (8,10), отличались от европейских и североамериканских стандартов. Более того, два недавних рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых клинических испытания, проведённых в США и европейских странах для доказательства клинической эффективности GMCAP при ЯК (11) и болезни Крона (12), продемонстрировали, что эффективность GMCAP не превосходила имитацию афереза. Таким образом, несмотря на практику Японии, текущие рекомендации гастроэнтерологических обществ США и Европы не рекомендуют GMCAP или лейкоцитаферез (LCAP) для клинической практики. Но анализ подгрупп в рамках исследования Сандса (Sands) и соавт. (11) показал лучший результат для группы GMCAP у пациентов с ЯК в острой стадии, что доказывает важность более критического отбора пациентов в исследованиях афереза.

Поставляемые на рынок системы цитафереза преимущественно удаляют гранулоциты (46%), моноциты/макрофаги (54%) и небольшое количество лимфоцитов (18,5%) и тромбоцитов (19%) (GMCAP) (13) или лимфоцитов (30-60%), тромбоциты (35%) помимо гранулоцитов и моноцитов (почти 100% клеток в кровопроводящей магистрали) (лейкоцитаферез, LCAP) (14). Сообщается, что оба метода эффективны для индукции и поддержания клинической ремиссии у пациентов с ЯК, резистентных к стероидам или ранее не принимавшим их. Они лишь в редких случаях вызывают побочные эффекты (9,15). Более того, нет значительных различий в клинической эффективности и клиническом течении болезни между LCAP и GMCAP (16). Были проанализированы несколько потенциальных методов действия GMCAP и LCAP. Обе системы имеют схожие эффекты, например, снижение количества активированных лейкоцитов, подавление провоспалительных цитокинов и модификацию молекул клеточной адгезии (10,17,18), которые вызывают противовоспалительный статус. Однако точный способ действия этих методов, которые являются промежуточным звеном в достижении терапевтических эффектов, может быть более сложным. Есть несколько доказательств того, что цитаферез вызывает дополнительное воздействие на врожденную иммунную систему и другие регуляторные процессы (18-20).

О прогностических факторах эффективности адсорбционного цитафереза сообщалось редко. Однако в нескольких отчётах указано, что снижение количества тромбоцитов может быть ранним маркёром положительного ответа у пациентов с ЯК в острой форме (21,22). Более того, было признано, что тромбоциты играют важную роль в патофизиологии ВЗК. Число тромбоцитов увеличивается во время обострения ВЗК и коррелируется в зависимости от тяжести заболевания (23). Тромбоциты способны активировать различные клетки, например, за счёт контакта с CD40L, секрецией растворимых CD40L и других хемокинов, способствующих адгезии лейкоцитов и их трансмиграции (24). Таким образом, разработка новых адсорберов тромбоцитов в дополнение к гранулоцитам и моноцитам, представляет собой интересный подход к лечению пациентов с ВЗК.

В этом исследовании был протестирован новый модульный фильтр-адсорбера для цитафереза, наполненный шариками из ионообменной смолы, который, в частности, удаляет тромбоциты, гранулоциты и моноциты из периферической крови. Было проведено проспективное открытое пилотное исследование для оценки безопасности, переносимости, технических характеристик и клинической эффективности этого устройства у пациентов с активным ЯК.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДОЛОГИЯ

Пациенты

Это проспективное исследование было проведено в соответствии с принципом надлежащей клинической практики ISO 14155 и Хельсинкской декларацией. Информированное согласие было получено от всех пациентов после того, как комиссия по этике Ростоцкого университета одобрила протокол исследования. Было выбрано 10 пациентов (6 мужчин и 4 женщины, средний возраст $\pm 47,1$ лет, минимальный возраст ± 25 лет, максимальный возраст ± 73 года) с ЯК высокой и умеренной активности, определяемой индексом клинической активности (CAI 6-10 согласно индексу Рахмилевича [25]). Пациентам не удалось достичь длительной ремиссии при приёме стероидов и/или иммунодепрессантов. У пациентов также были противопоказания или непереносимость высоких доз стероидов и/или иммунодепрессантов. Пациенты, принимавшие преднизолон более 30 мг/день, были исключены из этого исследования.

Средняя продолжительность заболевания составила 14 лет. 60% пациентов, страдающих ЯК выраженной активности, имели левосторонний колит (дистальный колит), а 40% - панколит. В основном, терапевтическое лечение пациентов включало 5-аминосалицилат (5-АСК), азатиоприн (Aza), такролимус и стероиды (таблица 1). Соответственно, 80% пациентов принимали стероиды в средней дозе 8 мг/день. Непосредственно перед началом афереза исследовали повреждение слизистой оболочки с помощью колоноскопии. Согласно Рахмилевичу (25), эндоскопические оценки выставляются эндоскопистом под

микроскопом, не имеющим никакого отношения к этому исследованию, с использованием эндоскопического индекса (EI). Средний EI до начала терапии аферезом составлял $7,4 \pm 5,2$ (диапазон 6-10).

Пациент					CAI	CAI	EI	EI
№	Стать	Возраст	Диагноз†	Лечение	до	Н10	до	Н10
1	М	54	Е2	Стероиды	10	2	6	2
2	М	32	Е2	Стероиды	10	1	6	2
3*	М	44	Е2	5-АСК Стероиды Такролимус	10	8	7	7
4*	М	55	Е2	5-АСК Стероиды	8	(5) [§]	8	10
5	Ж	55	Е3	5-АСК Стероиды	10	0	7	6
6	М	57	Е3	5-АСК Aza	7	0	— [¶]	— [¶]
7	М	72	Е2	Стероиды	7	4	10	8
8	Ж	42	Е2	5-АСК Aza	6	1	7	2
9	Ж	24	Е3	Стероиды	9	4	10	8
10	Ж	28	Е3	5-АСК Такролимус Стероиды	8	0	6	2

† Монреальская классификация (26)Ж У2Ж левосторонний ЯК (дистальный колит), Е3: ЯК выраженной активности (панколит). [¶]Пациент без ответа. [§]Пациент, принимающий стероиды в дозе 50 мг/день между 6 и 10 неделями после лечения новым устройством. [¶]Пациент, не давший согласия на эндоскопию.

Протокол проведения афереза

Пациенты прошли пять курсов лечения с использованием нового устройства для афереза с интервалом в одну неделю.

ТАБЛИЦА 1. Данные пациентов

Каждый сеанс длился 60 мин и при скорости кровотока 30 мл/мин.

Устройство Immunopure и забор образцов крови

Устройство Immunopure (производства компании «Никкисо» (Nikkiso), Токио, Япония) было разработано для использования для проведения гемоперфузии в обычных условиях через выборочное удаление гранулоцитов, моноцитов/макрофагов и тромбоцитов. Устройство представляет собой стерилизованный гамма-излучением, одноразовый модуль, наполненный шариками из ионообменной смолы диаметром 1,0 мм. Этот материал имеет долгую историю клинического применения в составе диализаторов на основе полисульфоновых полых волокон. Общий объем фильтр-адсорбера - 350 мл. Пустой объем устройства - 139 мл. Система афереза состоит из устройства, магистрали контура (ABT-002PX, производства компании «Никкисо» (Nikkiso)) и прибора для измерения потери крови (LPM-01, производства компании «НИККИСО Европа ГмбХ» (Nikkiso Europe GmbH), Ганновер, Германия).

Цитаферез проводили при скорости кровотока 30 мл/мин. в течение 60 мин. Нефракционированный гепарин (компания «Ратиофарм» (Ratiopharm), Ульм, Германия) вводили болюсно (75–150 МЕ/кг массы тела) в начале лечения с последующей непрерывной инфузией 50–100 МЕ/кг в курсе лечения. Кровь забирали из локтевой вены или вены предплечья, пропускали по колонке и вводили обратно в локтевую вену или вену предплечья контралатеральной руки. Образцы крови были взяты при скрининге (на 0 неделе, Н0), промежуточной оценке (на 6 неделе, Н6), окончательной оценке (на 10 неделе, Н10), а также до, во время и в конце каждого сеанса афереза (на протяжении 1- 5 недели, W1-5).

Безопасность, переносимость и биосовместимость

Жизненные показатели оценивались путём записи артериального давления, частоты пульса и температуры тела во время всех посещений. Артериальное давление и частоту пульса измеряли до, через 30 минут, в конце (после ретрансфузии) и через 15 минут после афереза. Температуру тела измеряли до и через 15 мин после афереза. Побочных эффектов зарегистрировано не было. Оценка безопасности основывалась также на лабораторных анализах количества клеток периферической крови, электролитов (Na⁺, K⁺, Ca²⁺), глюкозы в сыворотке, фибриногена, активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), протромбина по Квику (протромбинового индекса), международного нормализованного индекса (МНИ), общего белка, креатинкиназы (КК), альбумина, альфа-1-глобулина, альфа-2-глобулина, бета-глобулина и гамма-глобулина, иммуноглобулина класса G, M, A, E, фактора комплемента C3a (сравнения параметров в

начале и по завершении лечения, анализов во время лечения). Кроме того, креатин, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), билирубин, С-реактивный белок (СРБ) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ) анализировали только в начале всех сеансов (сравнение параметров между сеансами, анализ результатов). Анализы проводились сертифицированной независимой лабораторией.

Переносимость оценивалась для каждого курса афереза (до и после), а также на 6 и 10 неделе с помощью анкеты, которая позволяла пациентам и врачам оценивать лечение в соответствии с заранее определенной схемой (6 уровней, которые варьировались от «очень хорошо» до «очень плохо»).

Клиническая эффективность

Активность заболевания оценивали с помощью индекса САИ (до начала терапии и на 6 и 10 неделе), а также с помощью эндоскопического индекса (до начала терапии и на 10 неделе) и индекса Рахмилевича (25). Клиническая ремиссия при ЯК определялась по шкале САИ 4 или меньше. Клинический ответ определяется как снижение САИ > 3 или САИ < 4. Эндоскопическая ремиссия определяется как EI < 4 (25).

Проточная цитометрия

Антитела против следующих антигенов клеточной мембраны человека были предоставлены компанией «БД Биосаенс» (BD Biosciences) (Сан-Хосе, Калифорния, США): CD3, CD4, CD8, γ/δ Т-клеточный рецептор, HLA-DR, CD10, CD14, CD62L, CD11b, CD42b, CD63. Изотопически сходные нерелевантные антитела против мышинового IgG1 и IgG2a (производства компании «БД Биосаенс» (BD Biosciences)) использовали в качестве отрицательного контроля. Соответствующее количество антител добавляли к 50 мкл объёма циркулирующей крови. Образцы инкубировали в течение 20 мин. при 4°C. Затем добавляли 1 мл 1 x БД ФАКС лизирующий раствор (производства компании «БД Биосаенс» (BD Biosciences)) с последующей 10-минутной инкубацией при комнатной температуре в темноте. Клетки промывали один раз раствором BD CellWash (производства компании «БД Биосаенс» (BD Biosciences)) и сразу же анализировали на проточном цитометре FACS-Calibur (производства компании «БД Биосаенс» (BD Biosciences)). Для оценки объёма периферической крови, абсолютные количества различных популяций клеток были рассчитаны следующим образом: % x количество лейкоцитов/100. Подсчёт был скорректирован на гематокрит. Для окрашивания тромбоцитов периферическую кровь фиксировали в 1% растворе формальдегида/ фосфатно-солевом буферном растворе.

T_{reg} были идентифицированы с использованием набора для внутриклеточного окрашивания (производства компании «еБиосаенс» (eBioscience), Сан-Диего, Калифорния, США). Перед окрашиванием лимфоциты периферической крови выделяли центрифугированием в градиенте Перколла. Подготовленные клетки (1×10⁶) окрашивали смесью CD4 FITC/CD25 APC (по 10 мкл каждая, производства компании «еБиосаенс» (eBioscience)) или контрольными изотипами мышинных IgG1FITC/APC в течение 30 мин. После промывки раствором CellWash клетки инкубировали с 1 мл свежеприготовленного буфера для фиксации/пермеабиллизации (компонент набора) в течение 30 мин при 4°C в темноте. Образцы дважды промывали буферным раствором для пермеабиллизации (компонент набора) и инкубировали в течение 30 мин. с очищенным антителом, меченным фикоэритрином, против человеческого FoxP3 (PCN101) или изотипическим контролем крысиного IgG2a соответственно. Клетки промывали один раз буферным раствором для пермеабиллизации, ресуспендировали в 200 мкл раствора CellWash и анализировали на цитометре. Всего было зарегистрировано 200 000 событий. Данные анализировали с помощью программного обеспечения CellQuest (производства компании «БД Биосаенс» (BD Biosciences)). Клетки дифференцировали на CD4⁺CD25^{high}+FoxP3⁺ и CD4⁺CD25^{intermediate}+FoxP3⁺ T_{regs}.

Статистический анализ

Данные выражены как среднее±стандартное отклонение. Статистический анализ проводился с помощью теста Вилкоксона без параметров. Значения P < 0,05 считались статистически значимыми. Расчеты были выполнены с использованием SPSS версии 15.0 (SPSS, Чикаго, Иллинойс, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Переносимость

С помощью опроса в соответствии с установленными индексом общего самочувствия были получены данные, представленные в Таблице 2. Из них можно сделать вывод, что процедуры афереза показали переносимость от «хорошей» до «очень хорошей». За исключением случайных незначительных головных болей и проблем с пункциями, побочных эффектов не наблюдалось.

Таблица 2. Результаты опроса на переносимость лечения

Пациент №	1 курс	2 курс	3 курс	4 курс	5 курс	Визит 7	Визит 8
1	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо
2	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Очень хорошо	Хорошо	Хорошо	Очень хорошо
3 [†]	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Очень хорошо	Fair	Хорошо
4 [†]	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо
5	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Очень хорошо	Очень хорошо
6	Хорошо	Хорошо	Очень хорошо	Очень хорошо	Очень хорошо	хорошо	хорошо
7	Хорошо	Очень хорошо	Очень хорошо	Хорошо	Очень хорошо	Очень хорошо	Очень хорошо
8	Хорошо	Очень хорошо	Очень хорошо	Очень хорошо	Очень хорошо	хорошо	Очень хорошо
9	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо	Хорошо
10	Хорошо	Хорошо	Очень хорошо	Очень хорошо	Хорошо	Очень хорошо	Очень хорошо

[†]Пациент без ответа.

Лабораторные показатели безопасности и основные показатели состояния организма

Все 10 пациентов прошли исследование согласно предложенному протоколу. Лабораторные показатели безопасности между началом и завершением каждого сеанса афереза (во время лечения) и все оцениваемые параметры оставались в пределах нормы, за исключением значительного увеличения значений aPPT из-за антикоагуляции (таблица 3).

Таблица 3. Лабораторные показатели безопасности. Воздействие во время лечения.

Параметр	Показатели эффективности в начале лечения	Показатели эффективности после завершения лечения	Диапазон нормальных значений
Фибриноген (г/л)	4.2± 0.6	4.0± 0.7*	1.4-4.8
aACTB (сек.)	31.5± 6.6	212.1± 30.2*	25-36
Альбумин (г/л)	40.6± 3.0	37.1± 2.4*	35-50
Общий белок (г/л)	72.3± 3.5	66.8± 5.1*	64-83
Альбумин (%)	61.7± 3.7	60.8± 4.2	59.8-72.4
Альфа-1-глобулин (%)	3.3± 0.6	4.4± 3.2	1.0-3.2
Альфа-2-глобулин (%)	11.0± 2.1	11.0± 1.6	7.4-12.6
Бета-глобулин (%)	9.9± 0.6	9.4± 0.8*	7.5-12.9
Гамма-глобулин (%)	14.1± 2.5	14.4± 2.7	8.0-15.8
Иммуноглобулины G (г/л)	10.8± 1.9	9.9± 1.9*	7.0-16.0
Иммуноглобулины M (г/л)	1.4± 0.7	1.3± 0.6*	0.4-2.3
Иммуноглобулины A (г/л)	1.9± 0.9	1.71± 0.7*	0.7-4.0
Суммарные иммуноглобулины E (МЕ/мл)	47.5± 58.0	41± 49.4*	<220
Глюкоза (ммоль/л)	4.9± 1.4	5.2± 1.2	<7.8
K+ (ммоль/л)	4.3± 0.3	4.1± 0.4	3.6-5.4
Ca2+ (ммоль/л)	2.4± 0.1	2.3± 0.1*	2.1-2.55
Na+ (ммоль/л)	138.9± 1.4	138.0± 3.1	134-145
СК (мкмоль/л)	1.5± 1.1	1.3± 0.9*	<3.2

10 пациентов, % альбумина, альфа-1-глобулин, альфа-2-глобулин, бетаглобулин, гамма-глобулин, Суммарные иммуноглобулины E: 10 курсов лечения (1 неделя); фибриноген, иммуноглобулин (Ig), иммуноглобулин G, иммуноглобулин M, иммуноглобулин A, общий белок, СК: 20 курсов лечения (1 и 3 недели); глюкоза, K +, Ca2 +, Na +: 30 курсов лечения (1, 2 и 3 недели); ACTB, альбумин г / л: среднее - 50 курсов лечения (1-5 недели), среднее стандартное отклонение, * P <0,05 по сравнению с 0-минутным значением; критерий Уилкоксона.

В целом у пациентов наблюдалось небольшое повышение уровня альфа-1-глобулина, что, возможно, было связано с воспалительным состоянием (САI 6-10). Не наблюдалось долговременного воздействия (взаимного воздействия) промежуточных процедур афереза на лабораторные параметры безопасности, за исключением ожидаемых колебаний параметров коагуляции, таких как протромбин по Квику, значения МНИ и aACTB.

Температура тела во время лечения не значительно не изменялась. Частота сердечных сокращений и

артериальное давление были незначительно снижены (частота сердечных сокращений: с 79,7 / мин до 72,6 / мин. после 30-минутного курса лечения, 72,4 / мин. после завершения лечения; среднее артериальное давление: с 103,7 мм рт. ст. до 97,7 мм рт. ст. через 30 мин. после курса лечения, 100,2 мм рт. ст. после завершения лечения), что можно расценивать как положение покоя пациентов после начала лечения. Артериальное давление к концу лечения восстановилось.

Биосовместимость

Значения С3а значительно снизились после 15-минутной обработки в выходной линии устройства по сравнению с 0-минутными значениями. Через 60 минут уровни фактора комплемента С3а существенно не повысились (рис. 1).

Технические характеристики

Технические характеристики устройства оценивались путём расчёта абсолютных показателей сокращения популяций клеток периферической крови, собранных из линий притока и оттока в разное время одного сеанса афереза. Гематокрит был немного снижен после начала лечения (-2%) и до конца из-за эффектов разбавления (количество клеток корректировалось изменениями гематокрита). Количество эритроцитов незначительно увеличилось во время лечения (приток до 100,4%, отток до 100,7% через 15 мин. после лечения; 100,5% - в конце). Общее количество лейкоцитов эффективно снизилось максимум через 30-60 мин. после лечения и восстановилось до 99,6% после лечения. Количество моноцитов (приток до 87,3%, отток до 37,3% через 30 мин. после лечения), нейтрофильных гранулоцитов (приток до 93,8%, отток до 53,2% через 30 мин. после лечения), эозинофилов (приток до 88,4%, отток до 51,5% через 15 мин. после лечения) и тромбоцитов (приток до 98,9%, отток до 20,3% через 15 мин. после лечения) сильно снизились во время лечения. Однако после лечения показатели восстановились до 95%, 99%, 107% и 92% соответственно. Наблюдалось лишь небольшое изменение количества лимфоцитов (приток до 99,4%, отток до 93,8% после 30 мин. лечения, 103,9% в конце; рис. 2). Долгосрочного воздействия афереза на количество клеток периферической крови не наблюдалось, за исключением небольшого (в пределах нормы) снижения гемоглобина, гематокрита и количества эритроцитов между Н3 и Н6, которое полностью восстановилось к 10 неделе.

Изменения поверхностных маркеров клеток

Когда результаты сравнивались до и после каждого афереза, количество CD3 + CD4 + Т-хелперов немного увеличивалось (до 114% через 60 минут), в то время как количество CD3 + CD8 + цитотоксических Т-клеток не изменялось.

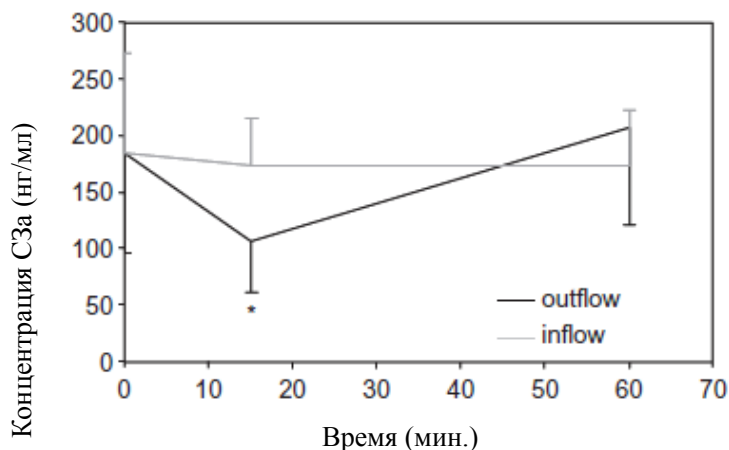
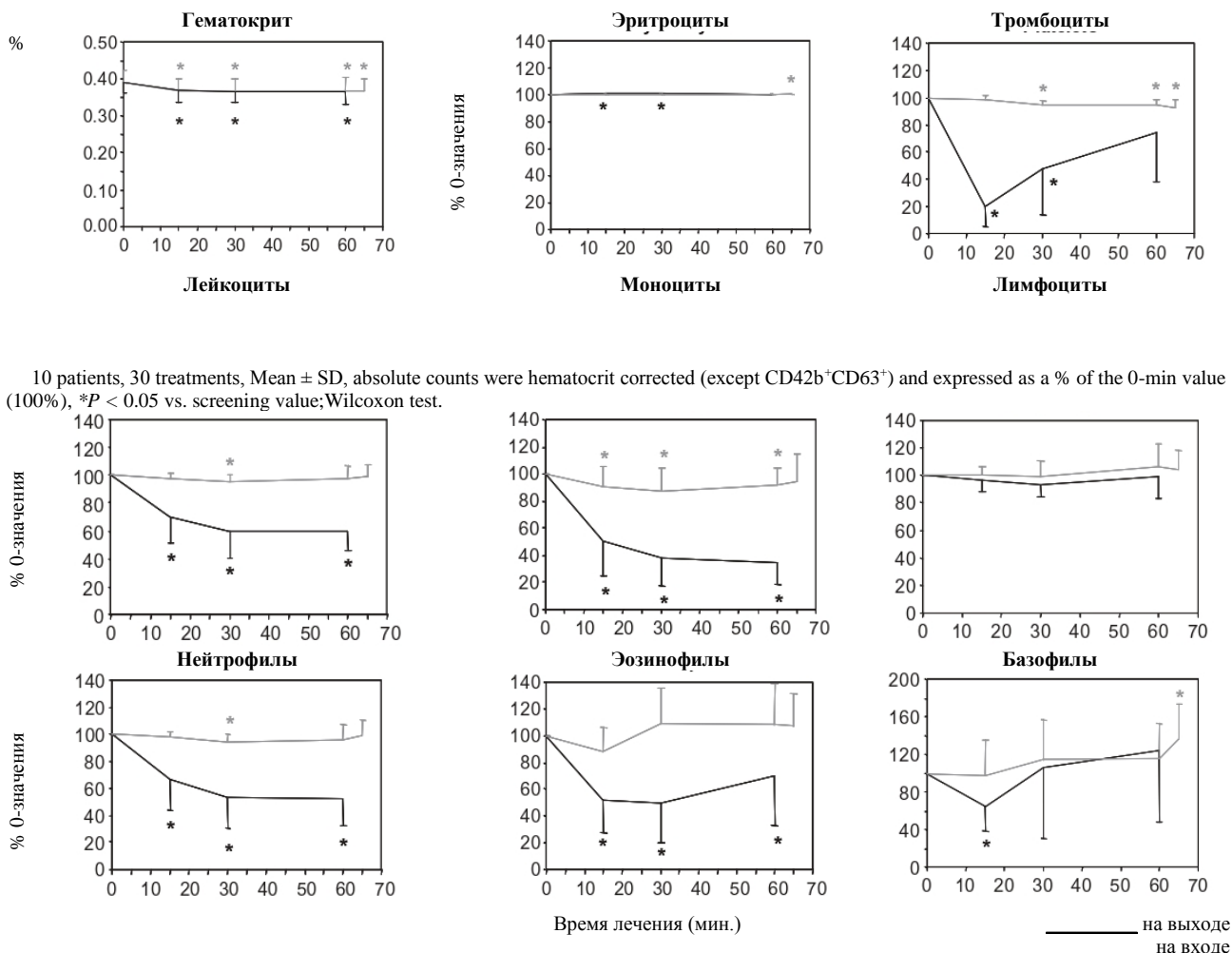


Рис. 1. Изменение фактора комплемента С3а во время афереза. Сравнение начальных (0 мин.) значений с 15- и 60-минутными значениями для одного сеанса лечения (1, 3 и 5 недели; 10 пациентов, 30 процедур, среднее ± стандартное отклонение, * P < 0,05 по сравнению со значением скрининга; критерий Уилкоксона).



10 patients, 30 treatments, Mean ± SD, absolute counts were hematocrit corrected (except CD42b⁺CD63⁺) and expressed as a % of the 0-min value (100%), *P < 0.05 vs. screening value; Wilcoxon test.

Рис. 2. Графики анализа крови - эффект воздействия в курселечения: сравнение начальных (0 минут) значений с 15, 30 и 60-минутными значениями для одного курса лечения (10 пациентов, 50 процедур, среднее значение ± стандартное отклонение, абсолютные значения выражены как % от нулевого значения [100%])

Количество клеток CD3⁺HLADR⁺ снизилось до 71% после 60 минут оттока, в то время как количество клеток CD4⁺CD25⁺ увеличилось до 118%. Количество Т-клеток, несущих γδ Т-клеточный рецептор, снижалось через 60 минут в притоке (до 91%) и оттоке (до 78%). Количество клеток CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ и CD4⁺CD25^{interm}FoxP3⁺ значительно снизилось через 60 минут оттока (таблицы 4,5).

Наблюдалось резкое снижение количества CD14⁺ моноцитов и CD10⁺ гранулоцитов во время лечения в оттоке (CD14⁺: до 45% через 60 минут, CD10⁺: до 54% через 60 минут). Скорость восстановления количества клеток CD62⁺ и CD11b⁺ была аналогична скорости восстановления гранулоцитов (CD62L⁺: до 57% после 60 минут в линии оттока; CD11b⁺: до 53% после 60 минут в линии оттока). Аналогично, изменений в этих клетках после 60 минут в линии притока не наблюдалось.

Средний показатель канальной флуоресценции клеток CD62L⁺, который отражает поверхностную экспрессию этого параметра на клетках, немного снизился в притоке через 15 мин. (до 92%) и в оттоке через 60 мин. обработки (до 86%). Средний показатель канальной флуоресценции клеток CD11b⁺ вырос на выходе из колонки только после 60 минут обработки (до 202%). Количество тромбоцитов, активированных CD42b⁺CD63⁺, во время лечения увеличивалось, особенно в линии оттока (таблицы 4,5). Длительного воздействия афереза на различные популяции клеток не наблюдалось.

ТАБЛИЦА 4. Модификация поверхностных маркеров клеток, воздействие во время лечения (W1, W3 и W5)

CD3 ⁺ CD4 ⁺	100.0	± 0.0	108.7	± 15.4*	107.4	± 17.6*	117.8	± 17.9*	113.6	± 18.1*
CD3 ⁺ CD8 ⁺	100.0	± 0.0	100.6	± 16.8	96.3	± 18.3	100.8	± 20.4	100.6	± 22.2
CD10 ⁺	100.0	± 0.0	102.1	± 12.3	66.2	± 24.7*	99.6	± 28.8	54.1	± 20.0*
CD14 ⁺	100.0	± 0.0	93.0	± 19.0*	48.0	± 29.9*	97.2	± 37.2	45.3	± 36.0*
CD62L ⁺	100.0	± 0.0	98.5	± 6.2	67.5	± 22.2*	98.7	± 16.7	57.0	± 17.6*
CD62L ⁺ Mean	100.0	± 0.0	92.0	± 14.9*	94.8	± 15.7	108.8	± 21.7*	85.6	± 21.7*

CD11b ⁺	100.0	± 0.0	96.7	± 5.9*	64.4	± 24.4*	95.4	± 15.3	52.6	± 20.5*
CD11b ⁺ Mean	100.0	± 0.0	108.0	± 43.8	103.8	± 41.9	119.7	± 51.4	202.2	± 84.2*
CD3 ⁺ HLADR ⁺	100.0	± 0.0	97.6	± 33.4	91.9	± 41.4	121.3	± 82.0	71.1	± 32.0*
CD42b ⁺ CD63 ⁺	100.0	± 0.0	117.3	± 107.0	389.2	± 529.1*	194.7	± 182.7*	409.8	± 343.3*
CD3 ⁺ TCRgS ⁺	100.0	± 0.0	113.7	± 105.1	79.9	± 56.6*	90.5	± 59.5*	78.4	± 31.1*

10 пациентов, 30 процедур, среднее ± стандартное отклонение, абсолютные значения гематокрита скорректированы (кроме CD42b⁺CD63⁺) и выражены как% от 0-минутного значения (100%), * P <0,05 по сравнению со скрининговым значением; критерий Уилкоксона.

Клиническая эффективность

На основании определения клинической ремиссии и клинического ответа (ремиссия: САИ<4, ответ: падение САИ>3 или САИ<4), частота ремиссии и ответа отражена в таблице 1. Среднее значение САИ снизилось с 8, ±1,5 (значение экранирования) до 4,5±4,1 на 6 неделе и 2,2±2,7 на 10 неделе (P<0,05). Ремиссия заболевания была достигнута у 8 из 10 пациентов (80%) на 10 неделе.

Клиническая ремиссия сопровождалась снижением эндоскопического индекса (EI <4) у 4 из 9 пациентов (44%), согласившихся на эндоскопическое обследование. Среднее значение EI у 9 подходящих пациентов снизилось с 7,4±1,6 (при скрининге) до 5,2±3,2 на 10 неделе (P <0,05). Хотя у 4 пациентов (44%) наблюдалась клиническая ремиссия в соответствии с улучшением показателей САИ, у 5 пациентов (56%) ремиссии не наблюдалось согласно их эндоскопическим показателям (EI> 4).

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Больным язвенным колитом часто назначают высокие дозы кортикостероидов. Цитаферез позволяет избежать побочных эффектов, которые возникают при приёме стероидов, и лечить пациентов, резистентных к ним. Однако такое лечение стоит дорого и его терапевтический успех варьируется у разных пациентов. Следовательно, новые разработанные устройства должны обеспечивать более высокую эффективность и соотношение цены и качества.

Это исследование является первым пилотным испытанием нового модульного фильтра-адсорбера для цитафереза, наполненного шариками из ионообменной смолы, у пациентов с активным ЯК. Исследование продемонстрировало очень хорошую переносимость этого устройства без каких-либо побочных эффектов. Процедуры афереза с использованием нового адсорбера гарантируют высокую степень безопасности. Все измеренные параметры безопасности практически не изменились как во время лечения, так и между курсами. Такие жизненно важные параметры, как артериальное давление, частота сердечных сокращений и температура тела, были практически стабильными во время курсов афереза.

Клинический ответ, полученный в этом исследовании, был обнадеживающим, так как 8 из 10 пациентов достигли ремиссии на 10 неделе. У 4 из 9 пациентов, согласившихся на эндоскопическое обследование, ремиссия САИ сопровождалась улучшением EI. Частота ответа полностью соответствовала данным, указанным в литературе относительно других устройств для адсорбционного цитафереза для пациентов, страдающих язвенным колитом выраженной активности (4,7,27).

ТАБЛИЦА 5. *Анализы T_{regs} с помощью проточной цитометрии, воздействие во время лечения (W1, W3 и W5)*

Параметр	0-мин.	15-мин. приток	15-мин. отток	60-мин. приток	60-мин. отток
CD4 ⁺ CD25 ⁺	100.0 ± 0.0	105.7 ± 17.0	121.1 ± 29.7*	117.6 ± 28.2*	118.2 ± 44.9*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Interm	100.0 ± 0.0	106.5 ± 18.0	122.3 ± 31.5*	118.4 ± 30.0*	124.0 ± 44.0*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ high	100.0 ± 0.0	104.4 ± 29.0	100.9 ± 29.9	97.6 ± 34.1	85.5 ± 34.9*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	100.0 ± 0.0	104.4 ± 27.0	114.6 ± 36.7	92.8 ± 35.8	83.1 ± 45.5*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ IntermFoxP3 ⁺	100.0 ± 0.0	102.9 ± 33.4	111.7 ± 44.3	93.6 ± 53.1	80.7 ± 59.4*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ highFoxP3 ⁺	100.0 ± 0.0	104.3 ± 26.3	115.8 ± 36.5*	93.7 ± 39.0	76.5 ± 38.4*

10 пациентов, 30 процедур, среднее ± стандартное отклонение,% от 0-минутного значения (100%), * P <0,05 по сравнению со значением скрининга; критерий Уилкоксона.

Во время контакта крови с искусственными поверхностями система комплемента активируется альтернативным путём. Низкая степень активации комплемента является выражением низкого потенциала активации контакта и высокой биосовместимости. Активация системы комплемента гранулами ацетата целлюлозы характеризовалась повышенными уровнями C3a и C5a плазмы в оттоке из колонки, не влияя на клиническую переносимость (13). В этом исследовании устройство показало превосходную биосовместимость, так как концентрации C3a в плазме не были повышены после лечения. Значения C3a значительно снизились после 15 минут обработки в выходной линии устройства по сравнению с 0-минутными значениями, что может быть связано с адсорбцией фрагментов комплемента в адсорбере или на клетках, прикрепленных к колонке. Однако через 60 мин. различия не были значительными.

Эксплуатационные характеристики нового устройства показали, что количество тромбоцитов (80%), моноцитов (66%) и нейтрофильных гранулоцитов (до 47%) значительно уменьшилось в линии оттока во время цитафереза. В конце лечения образцы крови, взятые непосредственно у пациента, показали, что количество гранулоцитов восстановилось, в то время как количество моноцитов и тромбоцитов все ещё продолжало уменьшаться на 5% и 8% соответственно по сравнению с исходными значениями. Возможно, это влияло на общий статус активации этих клеток в организме, даже если он возвращался к исходному уровню после более длительного периода наблюдения, что следует уточнить в дальнейших исследованиях. Показатель лимфоцитов и эритроцитов оставался относительно постоянным. Анализы проточной цитометрии подтвердили эти результаты и показали значительное сокращение количества моноцитов CD14⁺ и гранулоцитов CD10⁺. Таким образом, что касается показателей удаления клеток крови, новое устройство напоминает доступную селективную систему GMCAP на основе ацетата целлюлозы с более высокой способностью удаления тромбоцитов.

Основной целью лечения GMCAP было удаление активированных гранулоцитов и моноцитов из кровотока (28). Однако удаление первичных неиммунных клеток, таких как тромбоциты, также может иметь значение. Активированные тромбоциты участвуют в патогенезе ВЗК, секретируя различные биологически активные молекулы. Более того, они способны взаимодействовать с эндотелием слизистой оболочки и Т-клетками и создавать провоспалительную платформу, способствуя развитию воспалительного процесса (24). Важность этого эффекта подтверждается тем, что снижение количества активированных тромбоцитов сразу после первого LCAP можно считать ранним маркером для прогнозирования клинического ответа на лечение (21,22). В этом исследовании количество CD42b⁺CD63⁺- активированных тромбоцитов увеличивалось во время лечения, особенно в линии оттока. Однако количество тромбоцитов на выходе из колонки было очень низким. Таким образом, эта активация может утратить свою значимость.

Обычно адсорбционный цитаферез характеризуется иммуномодулирующим эффектом, о чем свидетельствуют его благоприятные долгосрочные клинические эффекты у пациентов с аутоиммунными заболеваниями. Ранее обсуждались изменения в профилях клеточной популяции, цитокинового ответа, активации сигнального пути, хоуминга и трансмиграции (29). Наблюдалось повторное уменьшение количества дендритных клеток, которые играют существенную роль в индукции иммунной толерантности (19). Недавние открытия подчеркивают значение регуляторных Т-клеток в объяснении долгосрочных эффектов лечения цитаферезом (20,30). Данные проточной цитометрии в этом исследовании показали небольшое увеличение как CD3⁺CD4⁺ Т-хелперных клеток, так и CD4⁺CD25⁺ клеток, что свидетельствует о незначительной активации или перераспределении Т-клеток, поскольку количество T_{reg}-клеток CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ повышалось только через 15 мин. после лечения, но затем значительно снижалось. Этот результат отличается от исследований с использованием других адсорберов (20,31) и может быть связан с характеристиками устройства. Тем не менее, полученные результаты показывают, что количество CD3⁺HLADR⁺ клеток (Т-клетки, активированные на поздней стадии) и Т-клеток, несущих Т-клеточный рецептор γ/δ , снизилось. Это подтверждает гипотезу о том, что терапия индуцировала противовоспалительный эффект. Анализ рецепторов переноса лейкоцитов CD62L и CD11b показал подавление экспрессии CD62L и повышение экспрессии CD11b. Этот результат также был зарегистрирован и в других исследованиях цитафереза и показал подавление диапедеза (31).

ВЫВОДЫ

В ходе этого пилотного исследования было доказано, что новое полуселективное устройство характеризуется безопасностью, хорошей переносимостью и клинической эффективностью у пациентов с язвенным колитом выраженной активности. Это исследование привело к одобрению использования устройства (маркировка ЕС). Полученные данные указывают на разницу между исследуемым устройством и другими адсорберами, представленными на рынке для более интенсивного удаления тромбоцитов, индукции незначительной активации Т-клеток и очень низкой активации комплемента. Частота ответа (80% ремиссия) в этом предварительном исследовании с небольшим числом пациентов была сопоставима или показала даже лучшие результаты по сравнению с уже известными методами цитафереза. Это положительное влияние на параметры эффективности заслуживает дальнейшей оценки в контролируемых испытаниях и исследованиях по подбору доз с большим числом пациентов.

Благодарность: исследование спонсировалось компанией «Никкисо» (NIKKISO), Токио, Япония. Отдельная благодарность Ане Рамлоу (Anja Ramlow), Аннет Бибер (Annett Bieber), Мануэле Зайдл (Manuela Seidl) и Кате Веддер (Katja Vedder), медперсоналу Центра афереза г. Росток, за отличную техническую поддержку. Стандартные лабораторные параметры оценивались в лаборатории «Д-ра Матик и партнёры» (Dr Matic and Partners) (г. Росток, Германия). Отдельный вклад авторов: В.Р. (WR): план и координация исследования, составление рукописи; Г.В. (GW):

анализ данных, план исследования, составление рукописи; Г.С. (GS): сбор данных, подготовка проб, анализ данных; Х.П. (HP): лечение пациентов; П.Б. (PB): анализ данных; Дж.Е. (JE): план исследования, лечение пациентов; все авторы: рецензирование, редактирование и утверждение окончательной рукописи.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бургер Д. (Burger D), Травис С. (Travis S.) Традиционное лечение воспалительного заболевания кишечника. *Научный журнал «Гастроэнтерология»* 2011;140:1827-37.
2. Доэрти Г.А. (Doherty GA), Шейфец А. С. (Cheifetz AS.) Ведение пациентов с острой формой язвенного колита. *Научный журнал «Экспертный обзор гастроэнтерологии и гепатологии»* 2009;3: 395-405.
3. Сэндборн В. Дж. (Sandborn WJ), Рутгерте П. (Rutgeerts P), Фиган Б. Г. (Feagan BG) и соавт. Сравнение показателей колэктомии после лечения язвенного колита плацебо или инфликсимаб. *Научный журнал «Гастроэнтерология»* 2009;137:1250-60.
4. Эммрих Дж. (Emmrich J), Петерманн С. (Petermann S), Новак Д. (Nowak D) и соавт. Лейкоцитаферез (LCAP) в ведении пациентов с хроническим язвенным колитом выраженной активности - результаты рандомизированного пилотного исследования. *Научный журнал «Болезни пищеварительного тракта и научные исследования»* 2007; 52:2044-53.
5. Умекита К. (Umekita K), Хидака Т. (Hidaka T), Уено С. (Ueno S) и соавт. Лейкоцитаферез (LCAP) и снижение уровня микрочастиц тромбоцитов (MPs), и увеличение уровня микрочастиц MPs гранулоцитов: возможная связь с влиянием LCAP на ревматоидный артрит. *Научный журнал «Современная ревматология»* 2009;19:265-72.
6. Суренсен Х. (Soerensen H), Шнайвинд-Мюллер Дж. М. (Schneidewind-Mueller JM), Лянг Д. (Lange D) и соавт. Пилотное клиническое исследование цитафереза с использованием колонки Adacolumn у пациентов с системной красной волчанкой. *Научный журнал «Международная ревматология»* 2006;26:409-15.
7. Ханан Х. (Hanai H), Иида Т. (Iida T), Такеучи К. (Takeuchi K) и соавт. Интенсивная адсорбция гранулоцитов и моноцитов по сравнению с внутривенным введением преднизолона у пациентов с тяжелой формой язвенного колита: открытое рандомизированное многоцентровое контролируемое исследование. *Научный журнал «Заболевания органов пищеварения и печени»* 2008;40: 433-40.
8. Симояма Т. (Shimoyama T), Савада К. (Sawada K), Танака Т. (Tanaka T) и соавт. Аферез гранулоцитов и моноцитов с колонкой G-1 в лечении пациентов с язвенным колитом выраженной активности. *Японский научный журнал афереза* 1999;18:117-31.
9. Савада К. (Sawada K), Мутто Т. (Muto T), Симояма Т. (Shimoyama T) и соавт. Многоцентровое рандомизированное контролируемое исследование лечения язвенного колита с помощью лейкоцитафереза. *Научный журнал «Современное фармацевтическое исполнение»* 2003;9:307-21.
10. Савада К. (Sawada K), Охниши К. (Ohnishi K), Косака Т. (Kosaka T) и соавт. Leukocytapheresis with leukocyte removal filter as new therapy for ulcerative colitis. *Ther Apher* 1997;1:207-11.
11. Сандс Б.Е. (Sands BE), Сандборн В. Дж. (Sandborn WJ), Фиган Б. (Feagan B) и соавт.; Исследовательская группа Adacolumn. Рандомизированное двойное слепое плацебо контролируемое исследование афереза гранулоцитов / моноцитов при язвенном колите выраженной активности. *Научный журнал «Гастроэнтерология»* 2008;135:400-9.
12. Сандс Б.Е. (Sands BE), Катц С. (Katz S), Вольф Д. К. (Wolf DC) и соавт. Рандомизированное двойное слепое плацебо контролируемое исследование афереза гранулоцитов/моноцитов при болезни Крона (умеренная и тяжелая формы). *Журнал «ЖКТ»* 2012;ИЦО:10.1136/gutjnl-2011-300995.
13. Рамлоу В. (Ramlow W), Эммрих Дж. (Emmrich J), Аренхольц П. (Ahrenholz P) и соавт. Оценка цитафереза с использованием колонки Adacolumn in vitro и in vivo у здоровых субъектов. *Журнал клинического афереза* 2005;20:72-80.
14. Шибата Х. (Shibata H), Курияма Т. (Kuriyama T), Ямаваки Н. (Yamawaki N.) Фильтр Cellsorba. *Научный журнал «Терапевтический аферез и диализ»* 2003;7:44-7.
15. Люнг Т. (Ljung T), Томсен О.О. (Thomsen OO), Ватн М. (Vatn M) и соавт. Аферез гранулоцитов, моноцитов/макрофагов при воспалительном заболевании кишечника: первые 100 пациентов, прошедших лечение в Скандинавии. *Скандинавский журнал гастроэнтерологии* 2007;42:221-7.
16. Саката И. (Sakata Y), Ивакири Р. (Iwakiri R), Амемори С. (Amemori S) и соавт. Сравнение эффективности адсорбтивного афереза гранулоцитов и моноцитов/макрофагов и лейкоцитафереза у пациентов с язвенным колитом выраженной активности: проспективное рандомизированное исследование. *Европейский журнал гастроэнтерологии и гепатологии* 2008;20:629-33.
17. Андох А. (Andoh A), Огава А. (Ogawa A), Китакура К. (Kitamura K) и соавт. Подавление воспалительных реакций, вызванных интерлейкином-1бета и фактором некроза опухоли альфа, с помощью лейкоцитафереза у пациентов с язвенным колитом. *Научный журнал «Гастроэнтерология»* 2004;39:1150-7.
18. Кашиваги Н. (Kashivagi N), Сугимура К. (Sugimura K), Койвай Х. (Koiwai H) и соавт. Иммуномодулирующие эффекты адсорбционного афереза гранулоцитов и моноцитов в лечении пациентов с язвенным колитом. *Научный журнал «Болезни пищеварительного тракта и научные исследования»* 2002;47:1334-41.
19. Вайц Г. (Waitz G), Петерманн С. (Petermann S), Лиеб С. (Liebe S), Эммрих Дж. (Emmrich J), Рамлоу В. (Ramlow W.) Уменьшение дендритных клеток с помощью адсорбционного афереза гранулоцитов и моноцитов у пациентов с язвенным колитом. *Научный журнал «Болезни пищеварительного тракта и научные исследования»* 2008;53:2507-15.
20. Ёкояма Ю. (Yokooyama Y), Фукунага К. (Fukunaga K), Фукуда Ю. (Fukuda Y) и соавт. Демонстрация низкорегуляторных субпопуляций CD25^{High}CD4⁺ и CD28-CD4⁺ с высоким уровнем провоспалительных Т-клеток у пациентов с язвенным колитом, модифицированных с помощью селективного афереза адсорбции гранулоцитов и моноцитов. *Научный журнал «Болезни пищеварительного тракта и научные исследования»* 2007;52:2725-31.
21. Такемото К. (Takemoto K), Курияма М. (Kuriyama M), Като Дж. (Kato J) и соавт. Коэффициент уменьшения тромбоцитов как ранний прогностический фактор эффективности лейкоцитафереза у пациентов с язвенным колитом. *Научный журнал «Терапевтический аферез и диализ»* 2009;13:6-13.
22. Фукунага К. (Fukunaga K), Фукуда Ё. (Fukuda Y), Ёкояма Ю. (Yokooyama Y) и соавт. Активированные тромбоциты как возможный ранний маркер в прогнозировании клинической эффективности лейкоцитафереза у пациентов с тяжелой формой язвенного колита. *Научный журнал «Гастроэнтерология»* 2006;41:524-32.
23. Харрис А. Д. (Harries AD), Фитцсимонс Е. (Fitzsimons E), Файфилд Р. (Fifield R), Дью М. Дж. (Dew MJ), Роудс Дж. (Rhoades J.) Количество тромбоцитов: простой способ измерения активности при болезни Крона. *Британский медицинский журнал* 1983;286:1476.
24. Данезе С. (Danese S.) Воспаление и микроциркуляция слизистой оболочки при воспалительном заболевании кишечника: приток и отток. *Научный журнал «Общепринятое мнение в гастроэнтерологии»* 2007;23:384-9.
25. Индекс Рахмилевича в интересах международной исследовательской группы. Месалазин с покрытием (5-аминосалициловая кислота) в сравнении с сульфасалазином при лечении язвенного колита выраженной активности. *Британский медицинский журнал* 1989;298:82-6.
26. Сатсанги Дж. (Satsangi J), Сильверберг М. С. (Silverberg MS), Вермейер С. (Vermeire S), Полковник Дж. Ф. (Colombel JF.) Монреальская классификация воспалительных заболеваний кишечника: разногласия, консенсус и последствия. *Научный журнал «ЖКТ»* 2006;55:749-53.

27. Савада К. (Sawada K), Кусугами К. (Kusugami K), Сузуки Й. (Suzuki Y) и соавт. Лейкоцитаферез при язвенном колите: результаты перспективного исследования с помощью плацебо с двойной анонимной выборкой методом случай-контроля с имитационным аферезом в качестве плацебо-терапии. *Американский научный журнал «Гастроэнтерология»* 2005;100:1362-9.
28. Канаи Т. (Kanai T), Хиби Т. (Hibi T), Ватанабэ М. (Watanabe M.) Методология лейкоцитафереза как естественной биологической терапии воспалительного заболевания кишечника. *Журнал «Мнение эксперта по биологической терапии»* 2006;6:453-66.
29. Абреу М. Т. (Abreu MT), Плеви С. (Plevy S), Сандс Б.Е. (Sands BE), Вайнштайн Р. (Weinstein R.) Селективный аферез лейкоцитов для лечения воспалительного заболевания кишечника. *Журнал клинической гастроэнтерологии* 2007;41:874-88.
30. Куадро Э. (Cuadrado E), доктор медицины Алонсо М. де Хуан (Alonso M de Juan), Эчаниз П. (Echaniz P), Арнас Т. И. (Arenas JI.) Т-регуляторные клетки у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, проходящих гранулоцитаферез с использованием колонки adacolumn. *Всемирный научный журнал «Гастроэнтерология»* 2008;14:1521-7.
31. Саниабади А. Р. (Saniabadi AR), Ханай Х. (Hanai H), Сузуки Ю. (Suzuki Y) и соавт. Adacolumn для селективного лейкоцитафереза как немедикаментозное лечение пациентов с нарушениями иммунной системы: дополнение или альтернатива к лекарственной терапии? *Журнал клинического афереза* 2005; 20:171-84.

First Human Application of a Novel Adsorptive-Type Cytapheresis Module in Patients With Active Ulcerative Colitis: A Pilot Study

Wolfgang Ramlow,¹ Grit Waitz,² Gisela Sparmann,² Heinrich Prophet,¹
Peggy Bodammer,³ and Jörg Emmrich^{3*}

¹Apheresis Center Rostock, ²BioArtProducts GmbH, and ³Division of Gastroenterology,
University of Rostock, Rostock, Germany

Abstract: The aim of this study was to evaluate the safety, tolerability, technical performance and clinical efficacy of a novel adsorptive-type cytapheresis module in patients with active ulcerative colitis. Ten patients with ulcerative colitis (clinical activity index 6–10) were recruited. The new adsorber (Nikkiso, Tokyo, Japan) was specifically designed to remove platelets, granulocytes and monocytes from peripheral blood using an extracorporeal circulation. Cytapheresis treatments were performed weekly for five consecutive weeks (each with a 60-min duration). Safety and tolerability were evaluated by investigating vital parameters, routine laboratory tests, adverse event reporting and a questionnaire. Disease activity was evaluated by assessing the clinical activity index as well as the endoscopic index, according to Rachmilewitz. Technical performance and biocompatibility were investigated by repeated measurements of cellular blood count, comple-

ment factor C3a and cell surface markers before, during and after the apheresis treatments. The cytapheresis treatments were “well” to “very well” tolerated by the patients. All measured safety parameters remained essentially unchanged. Performance data showed that platelets, monocytes and neutrophil granulocytes were effectively reduced during the cytapheresis treatments. Apheresis treatment was associated with high remission rates (80% at week 10). Clinical remission was accompanied by the reduction of the endoscopic index in four out of the nine eligible patients. Levels of C3a did not significantly increase during cytapheresis treatments. The novel device has been shown to be safe, well tolerated and clinically efficient. It offered a very good biocompatibility and platelet elimination capacity. **Key Words:** Granulocyte and monocyte adsorptive apheresis, Inflammatory bowel disease, Ulcerative colitis.

The etiology of inflammatory bowel diseases (IBD) is still not completely understood. The main treatment goal for the active disease is to achieve and maintain clinical remission by using treatment options with less potential for inducing side-effects.

To date, 5-aminosalicylic acid (5-ASA) and corticosteroids are the first-line treatment options for inducing remission in patients with active ulcerative colitis (UC) (1). Cumulative high doses or long-term steroid administration cause severe side-effects, and steroid-refractory cases have been reported (2).

In a substantial number of patients, colectomy as a last-resort treatment alternative cannot be avoided (3). Adsorptive cytapheresis has been proposed as a steroid-sparing, safe treatment strategy to achieve remission not only for IBDs but also for other immunological diseases, such as rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus (4–6). When comparing the efficacy and safety of intensive granulocyte/monocyte adsorption apheresis (GMCAP) with intensive intravenous prednisolone in patients with severe UC, GMCAP was comparable to or better than prednisolone. Moreover, the response to GMCAP was slower but more sustainable (7).

Several randomized controlled trials from Japan have demonstrated the clinical benefit of apheresis treatment in addition to a standard treatment over standard treatment alone (7–9). In contrast to Japan, adsorptive cytapheresis systems are not generally

Received May 2012; revised October 2012.

Address correspondence and reprint requests to Dr Grit Waitz, BioArtProducts GmbH, Nobelstr. 52, 18059 Rostock, Germany. Email: g.waitz@bioeng.de

*Professor Emmrich passed away during the final preparation of this manuscript.

covered by healthcare insurance in Europe, North America and most parts of the world. This is mainly because standard treatment and the selection of outcome parameters used in earlier Japanese trials (8,10) were different from European and North American standards. Moreover, two recent randomized, double-blind, sham-controlled clinical trials conducted in the US and European countries to prove clinical efficacy of GMCAP in UC (11) and Crohn's disease (12) demonstrated that the efficacy of GMCAP was not superior to sham apheresis. Thus, despite Japanese practice, current guidelines of US as well as European gastroenterological societies do not recommend GMCAP or leukocytapheresis (LCAP) for clinical practice. But, subgroup analyses within the study of Sands et al. (11) showed a clearly better outcome for the GMCAP group in patients with histologically more active UC proving the importance of a more critical patient selection in apheresis trials.

The commercially available cytappheresis systems preferentially adsorb granulocytes (46%), monocytes/macrophages (54%) and only a small number of lymphocytes (18.5%) and platelets (19%) (GMCAP) (13) or lymphocytes (30–60%), platelets (35%) in addition to granulocytes and monocytes (almost 100% of cells in the blood line of the device) (leukocytapheresis, LCAP) (14). Both methods have been reported to be effective in the induction and maintenance of clinical remission in steroid-refractory or steroid-naïve UC patients and only rarely cause adverse events (9,15). Moreover, there is no significant difference in clinical response and clinical course between LCAP and GMCAP (16). Several potential mechanisms investigating the mode of action of GMCAP and LCAP have been analyzed. Both systems have similar effects, for example, a reduction of activated leukocytes, down-regulation of proinflammatory cytokines and modification of adhesion molecule expression (10,17,18), which induce an anti-inflammatory status. However, the precise mode of action of these techniques, which mediate the therapeutic effects, might be more complex. There are several pieces of evidence to indicate that additional effects on the innate immune system and other regulatory processes are caused by cytappheresis (18–20).

Predictive factors for the efficacy of adsorptive cytappheresis have rarely been reported. However, several reports have indicated that a decrease of platelets may be an early marker for a beneficial response in patients with severe UC (21,22). Moreover, platelets have been recognized to play an important role in the pathophysiology of IBD. Platelet number increases during flare-ups of IBD and correlates with disease severity (23). Platelets are able to activate various cells, for

example, through contact with CD40L, secretion of soluble CD40L and other chemokines mediating leukocyte adhesion and transmigration (24). Therefore, the development of new adsorber materials preferentially adsorbing platelets in addition to granulocytes and monocytes is an interesting approach for the treatment of patients with IBD.

In this study, a novel adsorptive-type cytappheresis module filled with amorphous polyarylate resin beads, which particularly removes platelets, granulocytes and monocytes from the peripheral blood, has been tested. A prospective open-label pilot study has been conducted to evaluate the safety, tolerability, technical performance and clinical efficacy of this device in patients with active UC.

PATIENTS AND METHODS

Patients

This prospective study was conducted in accordance with the principle of ISO 14155 good clinical practice and the Declaration of Helsinki. Informed consent was received by all patients after the ethics committee of Rostock University had approved the study protocol. A total of 10 patients (six males, four females, mean age: 47.1 years, minimum age: 25 years, maximum age: 73 years) with moderately to severely active UC defined by the Clinical Activity Index (CAI 6–10 according to Rachmilewitz [25]), who had failed to achieve long-term remission with steroids and/or immunosuppressive agents or who had contraindications or were intolerant to high doses of steroids and/or immunosuppressive agents, were recruited. Patients on prednisolone more than 30 mg/day were excluded from this study.

The mean disease duration was 14 years. Sixty percent of the patients suffering from active UC exhibited a left-sided colitis (distal colitis), and 40% a pancolitis. In general, the patients' medications comprised 5-aminosalicylate (5-ASA), azathioprine (Aza), tacrolimus and steroids (Table 1). Accordingly, 80% of the patients received steroids at a mean concentration of 8 mg/day. Mucosal damage was investigated by colonoscopy immediately prior to the start of the apheresis therapy. Endoscopic evaluations were performed by an endoscopist who did not have any relation to this study using the endoscopic index (EI), according to Rachmilewitz (25). The mean EI prior to initiation of the apheresis therapy was 7.4 ± 5.2 (range 6–10).

Apheresis protocol

Patients received five treatment sessions with the novel apheresis device at one-week intervals.

TABLE 1. Patient data

Patient no.	Sex	Age	Diagnosis [†]	Treatment	CAI before	CAI W10	EI before	EI W10
1	M	54	E2	Steroids	10	2	6	2
2	M	32	E2	Steroids	10	1	6	2
3 [‡]	M	44	E2	5-ASA Steroids Tacrolimus	10	8	7	7
4 [‡]	M	55	E2	5-ASA Steroids	8	(5) [§]	8	10
5	F	55	E3	5-ASA Steroids	10	0	7	6
6	M	57	E3	5-ASA Aza	7	0	– [¶]	– [¶]
7	M	72	E2	Steroids	7	4	10	8
8	F	42	E2	5-ASA Aza	6	1	7	2
9	F	24	E3	Steroids 5-ASA Tacrolimus	9	4	10	8
10	F	28	E3	Steroids 5-ASA Aza	8	0	6	2

[†]Montreal classification (26); E2: left sided UC (distal UC), E3: extensive UC (pancolitis). [‡]Non-responder. [§]Patient received 50 mg/day steroids between W6 and W10 after treatment with the novel device. [¶]Patient did not consent to endoscopy.

Each session lasted 60 min and used a blood flow of 30 mL/min.

Immunopure device and blood sample collection

The Immunopure (Nikkiso, Tokyo, Japan) device has been designed to be used in a simple hemoperfusion setting by selectively adsorbing granulocytes, monocytes/macrophages and platelets. The device is a gamma ray-sterilized, single-use (disposable) module filled with amorphous polyarylate resin beads of 1.0 mm diameter. This material has a long history of clinical application as a part of hollow fiber dialyzers. The total adsorber volume was 350 mL. The void volume of the device was 139 mL. The apheresis system comprises the device, circuit lines (ABT-002PX, Nikkiso) and the blood monitor (LPM-01, Nikkiso Europe GmbH, Hanover, Germany).

Cytapheresis was conducted at a flow rate of 30 mL/min for 60 min. Unfractionated heparin (Ratiopharm, Ulm, Germany) was administered as a bolus (75–150 IU/kg body weight) at the beginning of the treatment, followed by the continuous infusion of 50–100 IU/kg per treatment. Blood was withdrawn from the cubital or forearm veins, circulated through the column and returned to the cubital or forearm veins of the contralateral arm. Blood samples were taken at screening (week 0, W0), intermediate evaluation (week 6, W6), final evaluation (week 10, W10) as well as before, during and at the end of each apheresis treatment (week 1–5, W1–5).

Safety, tolerability and biocompatibility

Vital signs were assessed by registering blood pressure, pulse rate and body temperature during all the visits. Blood pressure and pulse rate were measured before, at 30 min, at the end (after retransfusion) and 15 min after the apheresis session. Body temperature was measured before and 15 min after the apheresis session. Any adverse event was registered. Safety evaluations also included laboratory analyses of peripheral blood cell counts, electrolytes (Na⁺, K⁺, Ca²⁺), serum glucose, fibrinogen, partial thromboplastin time (PTT), Quick value (prothrombin time ratio), international normalized ratio (INR), total protein, creatine kinase (CK), albumin, alpha 1-globulin, alpha 2-globulin, beta-globulin and gamma-globulin, IgG, M, A, E, complement factor C3a (parameter comparison between the beginning and end of one treatment session, intra-treatment analyses). Additionally, creatine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (γ GT), bilirubin, C-reactive protein (CRP), and lactate dehydrogenase (LDH) were analyzed only at the beginning of all treatment sessions (parameter comparison between the treatment sessions, inter-treatment analyses). Analyses were performed by a certified external laboratory.

Tolerability was assessed for each single apheresis session (before and after) and at W6 and W10 using a questionnaire that allowed patients and physicians

to judge the treatment according to a pre-defined scheme (6 levels that ranged from “very well” to “very bad”).

Clinical efficacy

Disease activity was evaluated by assessing the CAI (before the start of the therapy and at W6 and W10) as well as the endoscopic index (before the start of the therapy and W10) both according to Rachmilewitz (25). Clinical remission in UC is defined as a CAI score of 4 or less. Clinical response is defined as a CAI drop ≥ 3 or CAI ≤ 4 . Endoscopic remission is defined as an EI < 4 (25).

Flow cytometry

Antibodies against the following human surface antigens were acquired from BD Biosciences (San Jose, CA, USA): CD3, CD4, CD8, γ/δ T cell receptor, HLADR, CD10, CD14, CD62L, CD11b, CD42b, CD63. Isotype-matched irrelevant antibodies against mouse IgG1 and IgG2a (BD Bioscience) were used as negative controls. In brief, the appropriate amount of an antibody was added to 50 μ L of total blood. The samples were incubated for 20 min at 4°C. Then, 1 mL of 1 \times BD FACS Lysing Solution (BD Bioscience) was added followed by a 10-min incubation period at room temperature in the dark. The cells were washed once with BD CellWash solution (BD Bioscience) and analyzed immediately on a FACS-Calibur (BD Bioscience) flow cytometer. For the estimation of peripheral blood counts, absolute numbers of the different cell populations were calculated as follows: percentage \times leukocyte number/100. The counts were hematocrit-corrected. For platelet staining, the peripheral blood was immediately fixed in 1% formaldehyde/PBS.

T_{regs} were identified using an intracellular staining kit (eBioscience, San Diego, CA, USA). Prior to staining, peripheral blood lymphocytes were isolated by Percoll gradient centrifugation. Prepared cells

(1×10^6) were stained with a CD4 FITC/CD25 APC cocktail (10 μ L each, eBioscience) or mouse IgG1FITC/APC isotype controls for 30 min. After washing (CellWash), the cells were incubated with 1 mL of freshly prepared Fixation/Permeabilization Buffer (kit component) for 30 min at 4°C in the dark. The samples were washed twice with Permeabilization Buffer (kit component) and incubated for 30 min with the anti-human FoxP3 (PCH101) PE antibody or rat IgG2a isotype control, respectively. The cells were washed once with Permeabilization Buffer, resuspended in 200 μ L of CellWash and analyzed immediately on the cytometer. A total of 200 000 events were acquired. Data were analyzed using the CellQuest (BD Bioscience) software. The cells were differentiated into CD4⁺CD25^{high}+FoxP3⁺ and CD4⁺CD25^{intermediate}+FoxP3⁺ T_{regs}.

Statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm SD. Statistical analysis was performed by the parameter-free Wilcoxon test. *P*-values of <0.05 were considered statistically significant. Calculations were performed using SPSS version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Tolerability

The questioning, according to the ascertained steps of well-being, resulted in the overview displayed by Table 2, which led to the conclusion that the apheresis treatments displayed “well” to “very well” tolerability. With the exception of occasional light headaches and puncture problems, no further side-effects or adverse events were observed.

Safety laboratory parameters and vital signs

All 10 patients finished the study according to the suggested protocol. Safety laboratory parameters between the beginning and end of each apheresis

TABLE 2. Results of the questioning for treatment tolerability

Patient no.	1st therapy	2nd therapy	3rd therapy	4th therapy	5th therapy	Visit 7	Visit 8
1	Well	Well	Well	Well	Well	Well	Well
2	Well	Well	Well	Very well	Well	Well	Very well
3 [†]	Well	Well	Well	Well	Very well	Fair	Well
4 [†]	Well	Well	Well	Well	Well	Well	Well
5	Well	Well	Well	Well	Well	Very well	Very well
6	Well	Well	Very well	Very well	Very well	Very well	Very well
7	Well	Very well	Very well	Well	Very well	Very well	Very well
8	Well	Very well	Very well	Very well	Very well	Very well	Very well
9	Well	Well	Well	Well	Well	Well	Well
10	Well	Well	Very well	Very well	Well	Very well	Very well

[†]Non-responder.

TABLE 3. Safety laboratory parameters. Intra-treatment impacts

Parameter	Treatment start values	Treatment end values	Normal range
Fibrinogen (g/L)	4.2 ± 0.6	4.0 ± 0.7*	1.4–4.8
aPTT (sec)	31.5 ± 6.6	212.1 ± 30.2*	25–36
Albumin (g/L)	40.6 ± 3.0	37.1 ± 2.4*	35–50
Total protein (g/L)	72.3 ± 3.5	66.8 ± 5.1*	64–83
Albumin (%)	61.7 ± 3.7	60.8 ± 4.2	59.8–72.4
Alpha 1-globulin (%)	3.3 ± 0.6	4.4 ± 3.2	1.0–3.2
Alpha 2-globulin (%)	11.0 ± 2.1	11.0 ± 1.6	7.4–12.6
Beta-globulin (%)	9.9 ± 0.6	9.4 ± 0.8*	7.5–12.9
Gamma-globulin (%)	14.1 ± 2.5	14.4 ± 2.7	8.0–15.8
IgG (g/L)	10.8 ± 1.9	9.9 ± 1.9*	7.0–16.0
IgM (g/L)	1.4 ± 0.7	1.3 ± 0.6*	0.4–2.3
IgA (g/L)	1.9 ± 0.9	1.71 ± 0.7*	0.7–4.0
IgE (IU/mL)	47.5 ± 58.0	41 ± 49.4*	<220
Glucose (mmol/L)	4.9 ± 1.4	5.2 ± 1.2	<7.8
K ⁺ (mmol/L)	4.3 ± 0.3	4.1 ± 0.4	3.6–5.4
Ca ²⁺ (mmol/L)	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.1*	2.1–2.55
Na ⁺ (mmol/L)	138.9 ± 1.4	138.0 ± 3.1	134–145
CK (μmol/sL)	1.5 ± 1.1	1.3 ± 0.9*	<3.2

10 patients, albumin %, alpha 1-globulin, alpha 2-globulin, beta-globulin, gamma-globulin, IgE: means of 10 treatment sessions (W1); fibrinogen, immunoglobulin (Ig) IgG, IgM, IgA, total protein, CK: means of 20 treatment sessions (W1, W3); glucose, K⁺, Ca²⁺, Na⁺: means of 30 treatment sessions (W1, W2, W3); aPTT, albumin g/L: means of 50 treatment sessions (W1–W5), Mean ± SD, **P* < 0.05 vs. 0-min value; Wilcoxon test.

session (intra-treatment) and all assessed parameters remained within the normal range, except for a significant increase of aPPT values due to anticoagulation (Table 3). In general, the patients had slightly increased alpha 1-globulin values, which was possibly due to the inflammatory status (CAI 6–10). There were no long-term impacts (inter-treatment) of the intermediary apheresis treatments on the safety laboratory parameters except from expected fluctuations in coagulation parameters such as Quick value, INR and aPTT values.

Body temperature did not show any distinctive changes during the treatment. Heart rate and blood pressure were slightly reduced (heart rate: from 79.7/min to 72.6/min after 30 min of treatment, 72.4/min at the end; mean arterial pressure: from 103.7 mm Hg to 97.7 mm Hg after 30 min of treatment, 100.2 mm Hg at the end), which can be ascribed to the resting position of the patients after starting the treatment. Blood pressure recovered toward the end of the treatments.

Biocompatibility

C3a values significantly decreased after 15 min of treatment in the outflow line of the device compared with the 0-min values. After 60 min, the levels of complement factor C3a were not significantly increased (Fig. 1).

Technical performance

The technical performance of the device was assessed by calculating the absolute reduction rates of peripheral blood cell populations collected from the inflow and outflow line at different time points of a single apheresis session. The hematocrit was slightly reduced after starting the treatment (–2%) until the end of the treatment because of dilutional effects (cell counts were corrected by hematocrit changes). The red blood cell count very slightly increased during the treatments (inflow to 100.4%, outflow to 100.7% after 15 min of treatment; 100.5% at the end). The total leukocyte count was effectively reduced with a maximum between 30 and 60 min and recovered to 99.6% after the treatment. Monocytes (inflow to 87.3%, outflow to 37.3% after 30 min), neutrophil granulocytes (inflow to 93.8%, outflow to 53.2% after 30 min), eosinophils (inflow to 88.4%, outflow to 51.5% after 15 min) and platelets (inflow to 98.9%, outflow to 20.3% after 15 min) were strongly reduced during the treatment. However, after the treatment, the recovery values were 95%, 99%, 107% and 92%, respectively. There was only a small impact on the lymphocytes (inflow to 99.4%, outflow to 93.8% after 30 min of treatment, 103.9% at the end; Fig. 2). There were no long-term impacts from the apheresis treatments on the peripheral blood cell counts with the exception of slight (within a normal range) hemoglobin, hematocrit and erythrocyte count decreases between W3 and W6, which completely recovered toward W10.

Modification of cell surface markers

When the results were compared before and after each apheresis session, CD3⁺CD4⁺ T helper

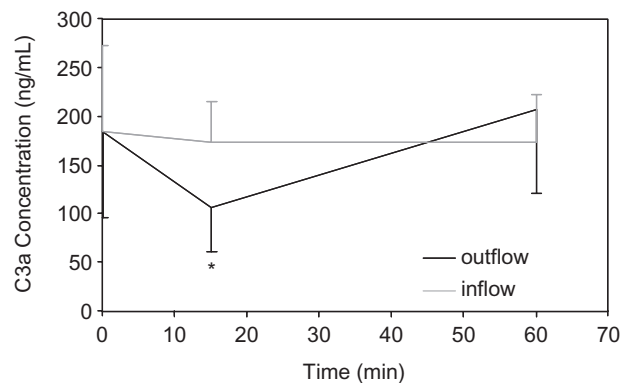


FIG. 1. Time course of the complement factor C3a during the apheresis treatments. Comparison of the start (0 min) vs. 15- and 60-min values for one treatment session (W1, W3 and W5; 10 patients, 30 treatments, Mean ± SD, **P* < 0.05 vs. screening value; Wilcoxon test).

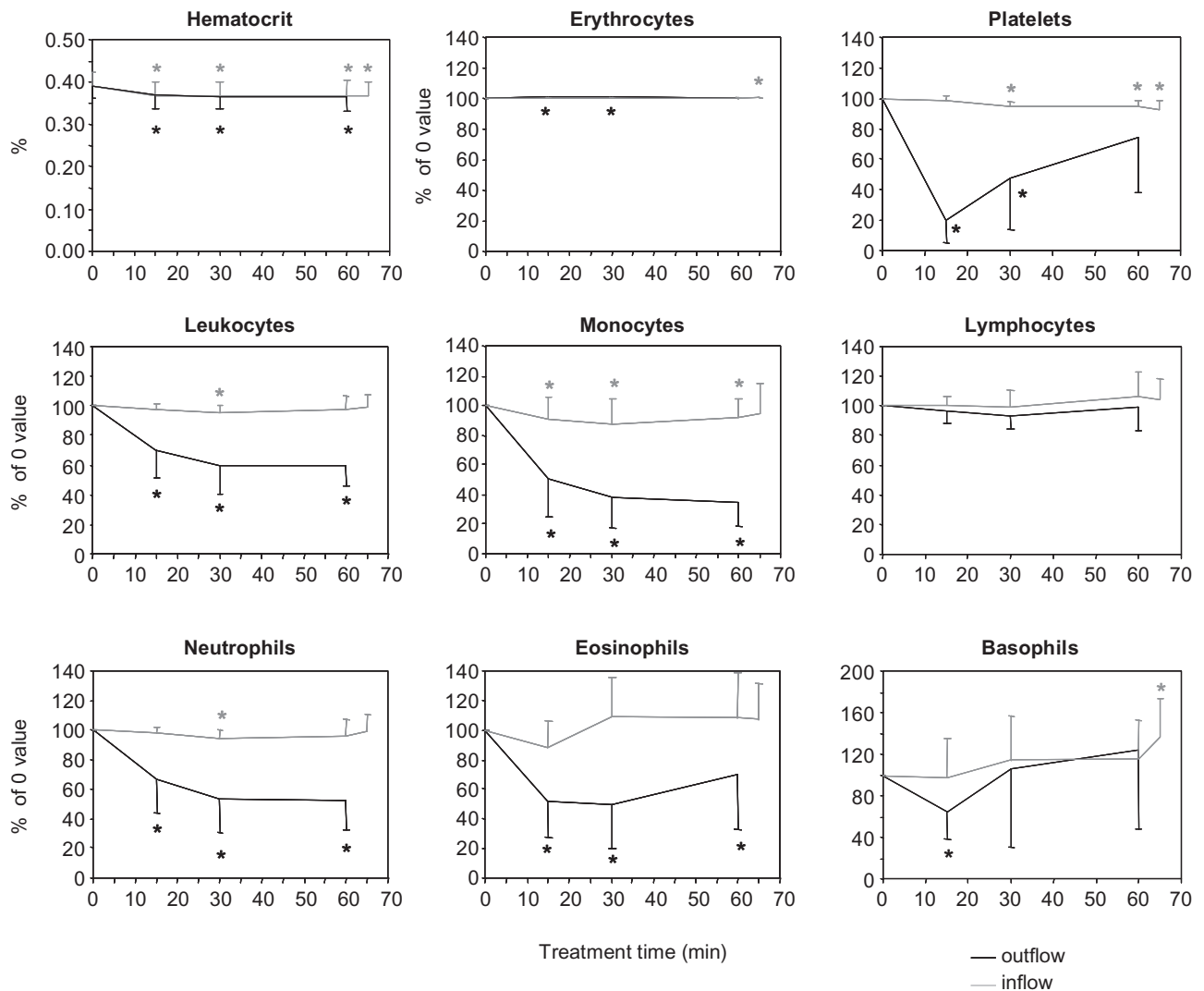


FIG. 2. Blood count graphs—*intra-treatment impacts*: Comparison of the start (0 min) vs. 15-, 30- and 60-min values for one treatment session (10 patients, 50 treatments, Mean \pm SD, absolute counts are expressed as a % of the 0-min value [100%]).

cells slightly increased (to 114% after 60 min), while CD3⁺CD8⁺ cytotoxic T-cells remained unchanged. CD3⁺HLADR⁺ cells were moderately reduced to 71% after 60 min in the outflow, while CD4⁺CD25⁺ cells increased to 118%. T-cells bearing the γ/δ T-cell receptor were moderately reduced after 60 min in the inflow (to 91%) and in the outflow (to 78%). CD4⁺CD25^{high} cells, CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ and CD4⁺CD25^{interm}FoxP3⁺ cells significantly decreased after 60 min in the outflow (Tables 4,5).

There was a strong reduction of CD14⁺ monocytes and CD10⁺ granulocytes during the treatments in the outflow (CD14⁺: to 45% after 60 min, CD10⁺: to 54% after 60 min) but not in the inflow. With regard to CD62L⁺ and CD11b⁺ cells, the reduction rates were similar to those of the granulocytes (CD62L⁺: to 57%

after 60 min in the outflow; CD11b⁺: to 53% after 60 min in the outflow). Similarly, there were no significant changes in these cells after 60 min in the inflow line.

The mean channel fluorescence of the CD62L⁺ cells, which reflects the surface expression of this parameter on the cells, slightly decreased in the inflow after 15 min (to 92%) and in the outflow after 60 min of treatment time (to 86%). The mean channel fluorescence of CD11b⁺ cells was moderately elevated in the column outflow only after 60 min of treatment time (to 202%). CD42b⁺CD63⁺-activated platelets increased during the treatment, especially in the outflow line (Tables 4,5). There were no long-term impacts from the apheresis treatments on the different cell populations.

TABLE 4. Modification of cell surface markers, intra-treatment impacts (W1, W3 and W5)

Parameter	0 min	15-min inflow	15-min outflow	60-min inflow	60-min outflow
CD3 ⁺ CD4 ⁺	100.0 ± 0.0	108.7 ± 15.4*	107.4 ± 17.6*	117.8 ± 17.9*	113.6 ± 18.1*
CD3 ⁺ CD8 ⁺	100.0 ± 0.0	100.6 ± 16.8	96.3 ± 18.3	100.8 ± 20.4	100.6 ± 22.2
CD10 ⁺	100.0 ± 0.0	102.1 ± 12.3	66.2 ± 24.7*	99.6 ± 28.8	54.1 ± 20.0*
CD14 ⁺	100.0 ± 0.0	93.0 ± 19.0*	48.0 ± 29.9*	97.2 ± 37.2	45.3 ± 36.0*
CD62L ⁺	100.0 ± 0.0	98.5 ± 6.2	67.5 ± 22.2*	98.7 ± 16.7	57.0 ± 17.6*
CD62L ⁺ Mean	100.0 ± 0.0	92.0 ± 14.9*	94.8 ± 15.7	108.8 ± 21.7*	85.6 ± 21.7*
CD11b ⁺	100.0 ± 0.0	96.7 ± 5.9*	64.4 ± 24.4*	95.4 ± 15.3	52.6 ± 20.5*
CD11b ⁺ Mean	100.0 ± 0.0	108.0 ± 43.8	103.8 ± 41.9	119.7 ± 51.4	202.2 ± 84.2*
CD3 ⁺ HLADR ⁺	100.0 ± 0.0	97.6 ± 33.4	91.9 ± 41.4	121.3 ± 82.0	71.1 ± 32.0*
CD42b ⁺ CD63 ⁺	100.0 ± 0.0	117.3 ± 107.0	389.2 ± 529.1*	194.7 ± 182.7*	409.8 ± 343.3*
CD3 ⁺ TCRγδ ⁺	100.0 ± 0.0	113.7 ± 105.1	79.9 ± 56.6*	90.5 ± 59.5*	78.4 ± 31.1*

10 patients, 30 treatments, Mean ± SD, absolute counts were hematocrit corrected (except CD42b⁺CD63⁺) and expressed as a % of the 0-min value (100%), **P* < 0.05 vs. screening value; Wilcoxon test.

Clinical efficacy

Based on the definitions of clinical remission and clinical response (remission: CAI ≤ 4, response: CAI drop ≥ 3 or CAI ≤ 4), the remission and response rates are reflected by Table 1. The average CAI was reduced from 8.5 ± 1.5 (screening value) to 4.5 ± 4.1 at W6 and 2.2 ± 2.7 at W10 (*P* < 0.05). Remission of the disease was achieved in 8 of the 10 patients (80%) at W10.

Clinical remission was accompanied by a reduction of the endoscopic index (EI < 4) in four of the nine patients (44%) who consented to endoscopic examination. The average EI of the nine eligible patients decreased from 7.4 ± 1.6 (screening value) to 5.2 ± 3.2 at W10 (*P* < 0.05). Although four patients (44%) had a clinical remission according to improvements in CAI score, five (56%) did not show remission based on their endoscopic scores (EI > 4).

DISCUSSION

Ulcerative colitis patients are frequently administered high doses of corticosteroids. Cytaapheresis has the potential to avoid steroid-mediated side-effects and to treat steroid-refractory patients. However, the treatment is expensive, and its therapeutic success varies. Therefore, newly developed

devices should provide an improved efficacy and cost-benefit ratio.

This study is the first pilot trial of a novel adsorptive-type cytaapheresis module filled with polyarylate resin beads in patients with active UC and has demonstrated that the tolerability of this device is well to very well without showing adverse side-effects. The apheresis treatments with the novel adsorber assured a high degree of safety. All measured safety parameters remained essentially unchanged both during intra-treatment and inter-treatment periods. Vital parameters, such as blood pressure, heart rate and body temperature, were essentially stable during the apheresis sessions.

The clinical response experienced in this study was promising as eight out of 10 patients were in remission at W10. In four out of nine patients who consented to endoscopic evaluation, CAI remission was accompanied by an improvement of the EI. The response rates were in full concordance with those reported in the literature for other adsorptive cytaapheresis devices for patients suffering from active ulcerative colitis (4,7,27).

During blood contact with artificial surfaces, the complement system is activated via the alternative pathway to a varying degree. A low degree of complement activation is an expression of a low contact

TABLE 5. Flow cytometry analyses of *T_{regs}*, intra-treatment impacts (W1, W3 and W5)

Parameter	0 min	15-min inflow	15-min outflow	60-min inflow	60-min outflow
CD4 ⁺ CD25 ⁺	100.0 ± 0.0	105.7 ± 17.0	121.1 ± 29.7*	117.6 ± 28.2*	118.2 ± 44.9*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ interm	100.0 ± 0.0	106.5 ± 18.0	122.3 ± 31.5*	118.4 ± 30.0*	124.0 ± 44.0*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ high	100.0 ± 0.0	104.4 ± 29.0	100.9 ± 29.9	97.6 ± 34.1	85.5 ± 34.9*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	100.0 ± 0.0	104.4 ± 27.0	114.6 ± 36.7	92.8 ± 35.8	83.1 ± 45.5*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ interm ⁺ FoxP3 ⁺	100.0 ± 0.0	102.9 ± 33.4	111.7 ± 44.3	93.6 ± 53.1	80.7 ± 59.4*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ high ⁺ FoxP3 ⁺	100.0 ± 0.0	104.3 ± 26.3	115.8 ± 36.5*	93.7 ± 39.0	76.5 ± 38.4*

10 patients, 30 treatments, Mean ± SD, % of 0-min value (100%), **P* < 0.05 vs. screening value; Wilcoxon test.

activation potential and high biocompatibility. Activation of the complement system by cellulose acetate beads has been shown by the increased levels of plasma C3a and C5a in the column outflow, without affecting the clinical tolerability (13). In this study, the device showed an excellent biocompatibility, as plasma C3a concentrations were not elevated after the treatment. C3a values significantly decreased after 15 min of treatment in the outflow line of the device compared with the 0-min values, which may be due to an adsorption of complement fragments to the adsorber or to cells attached to the column. However, after 60 min, differences were not significant.

Performance data from the new device showed that platelets (80%), monocytes (66%) and neutrophil granulocytes (to 47%) were effectively reduced in the outflow line during the cytappheresis treatments. At the end of the treatment, the blood samples directly collected from the patient showed that granulocyte numbers recovered, whereas monocytes and platelets still showed a reduction of 5% and 8%, respectively, compared with the basal values. Probably, this might have an influence on the overall activation status of these cells in the body even if they return to baseline after a longer observation period, which should be clarified in further studies. Lymphocytes and red blood cells remained relatively constant. Flow cytometry analyses confirmed these results and displayed a strong reduction of CD14⁺ monocytes and CD10⁺ granulocytes. Thus, concerning the removal characteristics, the novel device resembles the available cellulose acetate based selective GMCAP system with an additional higher platelet elimination capacity.

The primary aim of the GMCAP treatment was to remove activated granulocytes and monocytes from the circulation (28). However, even the removal of primary non-immune cells such as platelets might be important. Activated platelets participate in the pathogenesis of IBD by secreting a variety of biologically active molecules. Moreover, they are able to interact with the mucosal endothelium and T-cells and create a proinflammatory platform perpetuating the inflammatory process (24). The importance of this effect is supported by the result that the decrease in activated platelets immediately after the first LCAP may be an early marker for predicting the clinical response toward the treatment (21,22). In this study, we observed that the number of CD42b⁺CD63⁺-activated platelets increased during the treatment, especially in the outflow line. However, the platelet number at the column outlet was very low. Thus, this activation may be of decreased importance.

Generally, adsorptive cytappheresis has been ascribed an immunomodulatory effect, as shown by its

beneficial long-lasting clinical effects in patients with autoimmune diseases. Alterations in cell population profiles, modulation of the cytokine response, signaling, homing and transmigration pathways have previously been discussed (29). The repeated reduction of dendritic cells, which play a substantial role in the induction of immune tolerance, has been described (19). Recent findings emphasize the role of regulatory T-cells in explaining the long-term effects of cytappheresis treatments (20,30). The flow cytometry data from this study revealed a slight increase in both CD3⁺CD4⁺ T helper cells and CD4⁺CD25⁺ cells, which suggested minor T-cell activation or redistribution of these cells because CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ T_{regs} were elevated only after 15 min of treatment but then significantly decreased. This result is in contrast to studies using other adsorbers (20,31) and may be due to the characteristics of the device. Nevertheless, our results show that CD3⁺HLADR⁺ cells (late stage-activated T-cells) and T-cells bearing the γ/δ T cell receptor were reduced and support the hypothesis that the therapy induced an anti-inflammatory effect. The analysis of the leukocyte trafficking receptors CD62L and CD11b showed downregulation of CD62L expression and upregulation of CD11b expression. This result has also been reported by other cytappheresis studies and reveals a suppression of leukocyte extravasation (31).

CONCLUSION

During this pilot trial, the novel semi-selective device has been shown to be safe, well tolerated and clinically efficient in patients with active ulcerative colitis. This study led to approval status of the device (CE marking). Our data suggest a difference between the study device and other adsorbers on the market concerning a stronger removal of platelets, an induction of a slight T-cell activation and a very low complement activation. Response rates (80% remission) in this preliminary trial with small patient numbers were comparable or even better compared to already established cytappheresis techniques. This positive impact on efficacy parameters merits further evaluation in controlled trials and dose-finding studies with larger patient numbers.

Acknowledgments: This work was supported by NIKKISO, Tokyo, Japan (financial support). We thank Anja Ramlow, Annett Bieber, Manuela Seidl and Katja Vedder from the nursing staff of the Apheresis Center Rostock for excellent technical support. Routine laboratory parameters were measured in the laboratory of Dr Matic and partners (Rostock, Germany). Specific author contributions: WR: study design and coordination, drafting of the manuscript; GW: data analysis, study design, drafting of the manuscript;

GS: data collection, sample preparation, data analysis; HP: patient treatment; PB: data analysis; JE: study design, patient treatment; all authors: reviewing, editing and approving the final manuscript.

REFERENCES

- Burger D, Travis S. Conventional medical management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011;140:1827–37.
- Doherty GA, Cheifetz AS. Management of acute severe ulcerative colitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;3:395–405.
- Sandborn WJ, Rutgeerts P, Feagan BG et al. Colectomy rate comparison after treatment of ulcerative colitis with placebo or infliximab. *Gastroenterology* 2009;137:1250–60.
- Emmrich J, Petermann S, Nowak D et al. Leukocytapheresis (LCAP) in the management of chronic active ulcerative colitis—results of a randomized pilot trial. *Dig Dis Sci* 2007;52:2044–53.
- Umekita K, Hidaka T, Ueno S et al. Leukocytapheresis (LCAP) decreases the level of platelet-derived microparticles (MPs) and increases the level of granulocytes-derived MPs: a possible connection with the effect of LCAP on rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2009;19:265–72.
- Soerensen H, Schneidewind-Mueller JM, Lange D et al. Pilot clinical study of Adacolumn cytapheresis in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2006;26:409–15.
- Hanai H, Iida T, Takeuchi K et al. Intensive granulocyte and monocyte adsorption versus intravenous prednisolone in patients with severe ulcerative colitis: an unblinded randomised multi-centre controlled study. *Dig Liver Dis* 2008;40:433–40.
- Shimoyama T, Sawada K, Tanaka T et al. Granulocyte and monocyte apheresis with the G-1 column in the treatment of patients with active ulcerative colitis. *Jpn J Apher* 1999;18:117–31.
- Sawada K, Muto T, Shimoyama T et al. Multicenter randomized controlled trial for the treatment of ulcerative colitis with a leukocytapheresis column. *Curr Pharm Des* 2003;9:307–21.
- Sawada K, Ohnishi K, Kosaka T et al. Leukocytapheresis with leukocyte removal filter as new therapy for ulcerative colitis. *Ther Apher* 1997;1:207–11.
- Sands BE, Sandborn WJ, Feagan B et al.; Adacolumn Study Group. A randomized, double-blind, sham-controlled study of granulocyte/monocyte apheresis for active ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2008;135:400–9.
- Sands BE, Katz S, Wolf DC et al. A randomised, double-blind, sham-controlled study of granulocyte/monocyte apheresis for moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 2012; doi:10.1136/gutjnl-2011-300995.
- Ramlow W, Emmrich J, Ahrenholz P et al. In vitro and in vivo evaluation of Adacolumn cytapheresis in healthy subjects. *J Clin Apher* 2005;20:72–80.
- Shibata H, Kuriyama T, Yamawaki N. Cellsorba. *Ther Apher Dial* 2003;7:44–7.
- Ljung T, Thomsen OØ, Vatn M et al. Granulocyte, monocyte/macrophage apheresis for inflammatory bowel disease: the first 100 patients treated in Scandinavia. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:221–7.
- Sakata Y, Iwakiri R, Amemori S et al. Comparison of the efficacy of granulocyte and monocyte/macrophage adsorptive apheresis and leukocytapheresis in active ulcerative colitis patients: a prospective randomized study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:629–33.
- Andoh A, Ogawa A, Kitamura K et al. Suppression of interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha-induced inflammatory responses by leukocytapheresis therapy in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 2004;39:1150–7.
- Kashiwagi N, Sugimura K, Koizumi H et al. Immunomodulatory effects of granulocyte and monocyte adsorption apheresis as a treatment for patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2002;47:1334–41.
- Waitz G, Petermann S, Liebe S, Emmrich J, Ramlow W. Reduction of dendritic cells by granulocyte and monocyte adsorption apheresis in patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2008;53:2507–15.
- Yokoyama Y, Fukunaga K, Fukuda Y et al. Demonstration of low-regulatory CD25High⁺CD4⁺ and high-pro-inflammatory CD28⁺CD4⁺ T-Cell subsets in patients with ulcerative colitis: modified by selective granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *Dig Dis Sci* 2007;52:2725–31.
- Takemoto K, Kuriyama M, Kato J et al. Ratio of platelet reduction is an early predictive factor for the effectiveness of leukocytapheresis for ulcerative colitis patients. *Ther Apher Dial* 2009;13:6–13.
- Fukunaga K, Fukuda Y, Yokoyama Y et al. Activated platelets as a possible early marker to predict clinical efficacy of leukocytapheresis in severe ulcerative colitis patients. *J Gastroenterol* 2006;41:524–32.
- Harries AD, Fitzsimons E, Fifield R, Dew MJ, Rhoades J. Platelet count: a simple measure of activity in Crohn's disease. *Br Med J* 1983;286:1476.
- Danese S. Inflammation and the mucosal microcirculation in inflammatory bowel disease: the ebb and flow. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:384–9.
- Rachmilewitz D. on behalf of an international study group). Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis. *Br Med J* 1989;298:82–6.
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749–53.
- Sawada K, Kusugami K, Suzuki Y et al. Leukocytapheresis in ulcerative colitis: results of a multicenter double-blind prospective case-control study with sham apheresis as placebo treatment. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1362–9.
- Kanai T, Hibi T, Watanabe M. The logics of leukocytapheresis as a natural biological therapy for inflammatory bowel disease. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6:453–66.
- Abreu MT, Plevy S, Sands BE, Weinstein R. Selective leukocyte apheresis for the treatment of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2007;41:874–88.
- Cuadrado E, Alonso M, de Juan MD, Echaniz P, Arenas JI. Regulatory T cells in patients with inflammatory bowel diseases treated with adacolumn granulocytapheresis. *World J Gastroenterol* 2008;14:1521–7.
- Saniabadi AR, Hanai H, Suzuki Y et al. Adacolumn for selective leukocytapheresis as a non-pharmacological treatment for patients with disorders of the immune system: an adjunct or an alternative to drug therapy? *J Clin Apher* 2005;20:171–84.