

Dissertation



Die adsorptive Zytapherese bei Colitis ulcerosa mit zusätzlicher Thrombozyten-Modulation

In-vitro und in-vivo Versuche mit einem neuen Adsorbermodul

Matthias Schneider

2020

Südstadt Klinikum Rostock - Klinik für Innere Medizin IV

Direktor: Prof. Dr. med Hans-Christof Schober



Die adsorptive Zytapherese bei Colitis ulcerosa mit zusätzlicher Thrombozyten-Modulation

In-vitro und in-vivo Versuche mit einem neuen Adsorbermodul

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von Matthias Schneider, geb. am 14.01.1989 in Flensburg
wohhaft in Hamburg
Rostock, der 28.07.2020

Dekan der Universitätsmedizin: Herr Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Hans-Christof Schober. Südstadt Klinikum Rostock.
2. Gutachter: Prof. Steffen Mitzner. Universitätsklinikum Rostock.
3. Gutachter: Prof. Stefan Jäckle. St. Adolf Stift Reinbek.

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2021

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	Seite 1
1.1	Stand der Forschung zur Colitis ulcerosa	Seite 1
1.1.1	Epidemiologie	Seite 1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese	Seite 2
1.1.2.1	Pathogenese	Seite 2
1.1.2.2	Multifaktorielle Einflüsse	Seite 3
1.1.2.3	Genetische Faktoren	Seite 4
1.1.2.4	Epigenetische Faktoren	Seite 5
1.1.2.5	Gastrointestinales Immunsystem	Seite 5
1.1.2.6	Rolle der Thrombozyten	Seite 7
1.1.2.7	Mikropartikel	Seite 8
1.1.2.8	Lösliches P-Selektin (sP-Selektin)	Seite 8
1.1.2.9	CD40-Ligand	Seite 9
1.1.3	Klinik	Seite 9
1.1.3.1	Extraintestinale Manifestationen und Komplikationen	Seite 11
1.1.4	Diagnostik	Seite 12
1.1.4.1	Diagnostik nach aktualisierter deutscher Leitlinie 2018 und dem ECCO Consensus-Papier 2017	Seite 12
1.1.4.2	Labordiagnostik	Seite 13
1.1.5	Therapie	Seite 14
1.1.5.1	Therapie - nach aktualisierter deutscher Leitlinie 2018 und dem ECCO Consensus-Papier 2017	Seite 14
1.1.5.2	Therapeutische Ansätze außerhalb der Leitlinientherapie	Seite 17
1.1.6	Verlauf und Prognose	Seite 18
1.2	Therapeutische Apherese	Seite 19
1.2.1	Einsatzgebiete	Seite 19
1.2.2	Adsorptive Zytaphereseverfahren	Seite 20
1.2.2.1	Cellsorba®	Seite 20
1.2.2.2	Adacolumn®	Seite 21
1.2.2.3	Immuloc®	Seite 22
1.2.2.4	Immunopure®	Seite 23
1.2.2.5	Übersicht - Vergleich der Apherese-Verfahren	Seite 24
1.2.3	Aktueller Status der Zytapherese	Seite 24
II.	Ziele und Fragestellungen dieser Dissertation	Seite 29
III.	Patienten und Methoden	Seite 30
3.1	Anwendungsbeobachtung zur Wirkung der Zytapherese in vivo an sechs Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa	Seite 30

3.1.1	Einschlusskriterien	Seite 30
3.1.2	Ausschlusskriterien	Seite 30
3.1.3	Vorstellung der Patienten	Seite 30
3.1.4	Abbruchkriterien	Seite 31
3.1.5	Kontrollgruppe	Seite 31
3.1.6	Das Immunopure® -Zytaphereseverfahren	Seite 31
3.1.7	Beobachtungsplan	Seite 32
	3.1.7.1 Ablauf der Apheresetherapie	Seite 32
	3.1.7.2 Untersuchungsparameter	Seite 33
3.1.8	Evaluierung ein Jahr nach Ende der Anwendungsbeobachtung	Seite 34
3.2	In vitro Rezirkulationsmodell	Seite 34
3.2.1	Aufbau	Seite 34
3.3	Methoden	Seite 37
3.3.1	Großes Blutbild	Seite 37
3.3.2	Durchflusszytometrie	Seite 37
	3.3.2.1 Durchführung	Seite 37
3.3.3	Bestimmung zirkulierender Mikropartikel aus Thrombozyten	Seite 38
3.3.4	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	Seite 40
	3.3.4.1 P-Selektin-Nachweis im Plasma	Seite 40
	3.3.4.2 CD40 Ligand-Nachweis im Plasma	Seite 40
3.3.5	Immunfluoreszenz	Seite 41
3.3.6	Hämatokrit-Korrektur	Seite 42
3.3.7	Statistische Analysen	Seite 42
IV.	Ergebnisse	Seite 43
4.1	Das in vitro Rezirkulationsmodell	Seite 43
4.1.1	Wirkung auf Blutzellen	Seite 43
	4.1.1.1 Wirkung der Apherese mittels Immunopure®-Minimodul und Leermodul auf das Blutbild	Seite 43
	4.1.1.2 Wirkung auf Oberflächenmarker	Seite 46
	4.1.1.3 Wirkung auf Mikropartikel	Seite 51
	4.1.1.4 Wirkung auf sP-Selektine	Seite 51
	4.1.1.5 Wirkung auf CD40-Liganden	Seite 52
4.1.2	Untersuchung der Polyarylat-Resin-Kugeln mit dem konfokalem Rastermikroskop	Seite 53
4.2	In-Vivo - Die Anwendungsbeobachtung	Seite 54
4.2.1	Patientencharakteristika	Seite 54
4.2.2	Therapieansprechen	Seite 54

4.2.3	Wirkung der Apherese	Seite 55
4.2.3.1	Vitalparameter	Seite 55
4.2.3.2	Blutbild	Seite 56
4.2.3.3	Veränderungen des Blutbildes über fünf Wochen	Seite 58
4.2.3.4	Anzahl der Oberflächenmarker	Seite 59
4.2.4	Wirkung auf Mikropartikel	Seite 63
4.2.5	Wirkung auf sP-Selektin	Seite 64
4.2.6	Wirkung auf CD40-Liganden	Seite 64
4.2.7	Technische Durchführbarkeit	Seite 65
4.2.8	Evaluierung ein Jahr nach Ende der Anwendungsbeobachtung	Seite 65
4.3	Die Kasuistiken	Seite 67
4.3.1	Patient 1	Seite 67
4.3.2	Patient 2	Seite 67
4.3.3	Patient 3	Seite 68
4.3.4	Patient 4	Seite 69
4.3.5	Patient 5	Seite 69
4.3.6	Patient 6	Seite 70
V.	Diskussion	Seite 71
5.1	Das Immunopure® Verfahren: Wirkung und Wirksamkeit	Seite 71
5.1.1	Diskussion: Effektivität der Apherese	Seite 71
5.1.2	Wirkung auf Thrombozyten	Seite 71
5.1.3	Wirkung auf Vitalparameter	Seite 72
5.1.4	Wirkung auf weitere Target-Zellen	Seite 73
5.1.5	Wirkung auf Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate	Seite 74
5.1.6	Wirkung auf Aktivierungsmarker	Seite 75
5.1.7	Wirkung auf Mikropartikel, sP-Selektin und CD40L	Seite 76
5.1.8	Bilder mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop	Seite 77
5.1.9	Sicherheit	Seite 79
5.2	Die Apheresetherapie im Vergleich mit - sowie unter Einbeziehung der konventionellen Therapie	Seite 79
5.3	Diskussion: Wie kann die Apheresetherapie möglichst sinnvoll im Therapieregime der Colitis ulcerosa angewandt werden?	Seite 82
VI.	Schlussfolgerung	Seite 86
VII.	Literaturverzeichnis	Seite 88
VIII.	Anhang	
IX.	Danksagung	
X.	Lebenslauf	

I Einleitung

Die Colitis ulcerosa zählt zusammen mit dem Morbus Crohn zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Seit der Erstbeschreibung der Colitis ulcerosa im Jahre 1859 durch Sir Samuel Wilks konnten Ätiologie und Pathogenese nur bruchstückhaft geklärt werden. Eine kausale Therapie existiert bis heute nicht.

Bei weltweit steigender Inzidenz kommt der Erforschung der Colitis ulcerosa folglich eine immer größere Bedeutung zu. Thrombozyten stehen im Verdacht, stärker in die Pathogenese der Colitis ulcerosa involviert zu sein als bisher bekannt. Ramlow et al. zeigten in einer Pilotstudie 2013, dass der Zytapherese-Adsorber Immunopure® neben Entzündungszellen wie Monozyten und Granulozyten auch Thrombozyten effektiv entfernen kann. Die Apheresebehandlungen waren mit hohen Remissionsraten bei einem guten Sicherheitsprofil assoziiert [1]. Ein großer Anteil an Patienten mit Colitis ulcerosa ist steroid-abhängig oder therapie-refraktär gegenüber zugelassenen Medikamenten.

Es besteht ein dringender Bedarf, diese Patientengruppe adäquat zu behandeln.

Nach dem Versagen vorhandener Therapien bleibt oft nur die Proktokolektomie als letzte Behandlungsmöglichkeit. Nach einer Studie von Conrad et al. wünschen sich 83% der Colitis ulcerosa-Patienten Informationen über alternative Behandlungsmethoden [2]. Dies zeigt, dass seitens der Patienten ein großes Interesse an neuen und nebenwirkungsarmen Therapiestrategien besteht. Eine Vielzahl neuer Therapien zur Behandlung der Colitis ulcerosa wird gegenwärtig diskutiert und in klinischen Studien untersucht [3].

1.1 Stand der Forschung zur Colitis ulcerosa

1.1.1 Epidemiologie

In der Prävalenz und Inzidenz der Colitis ulcerosa sind deutliche regionale Unterschiede festzustellen. Prinzipiell ist die Prävalenz in den westlichen Industrienationen am größten: In Europa beträgt sie durchschnittlich 505/100.000 Einwohner, in Nordamerika 249/100.000 Einwohner [4]. In Deutschland wurde die Prävalenz im Jahre 2010 mit 410/100.000 Einwohner angegeben [5]. Eher niedrig ist sie hingegen mit 44,3/100.000 in Indien [5]. Die Inzidenz liegt in Deutschland bei 3-3,9/100.000 Einwohnern [6, 7].

Weltweit nimmt sie jedoch zu und ist seit 1962 von 6,3 auf 9,0/100.000 Einwohner gestiegen [8]. Die Inzidenzen in den Wohlstandsgesellschaften Europas (24,3/100000 Einwohner) weisen hierbei im Vergleich zu anderen Regionen wie zum Beispiel Asien (6,3/100000 Einwohner) starke regionale Unterschiede auf [4]. Innerhalb westlicher Gesellschaften weisen ländliche Regionen geringere Inzidenzen als urbane Regionen auf [9]. In Europa selbst gibt es ein Ost-West sowie Nord-Süd Gefälle [10].

Die steigende Diagnostikrate liegt einerseits vermutlich an den besseren Diagnostikmöglichkeiten und neueren medizinischen Erkenntnissen in den Industrieländern. Andererseits spielen auch veränderte Ernährungsgewohnheiten und bessere Hygienestandards eine Rolle. Der prinzipielle Anstieg von Inzidenz und Prävalenz verdeutlicht, dass die Colitis ulcerosa weltweit als Volkskrankheit einer immer stärkeren Wahrnehmung bedarf. In der Altersverteilung zeigt die Colitis ulcerosa einen zweigipfligen Verlauf. Die Mehrheit der Erkrankten ist zwischen 15 und 30 Jahren alt. Bei 15 - 25% der Patienten beginnt die Erkrankung vor dem 20. Lebensjahr, in wenigen Fällen sogar schon im Säuglingsalter [11]. Ein zweiter Gipfel zeigt sich bei 50 – 70-jährigen Patienten. Zum Zeitpunkt der Diagnose befinden sich 10% der Patienten bereits in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung [12]. Hiervon ausgehend entwickeln 83% der Patienten einen chronisch rezidivierenden Krankheitsverlauf [13]. In Bezug auf das Geschlecht zeigten Studien keinen oder nur einen sehr geringen Unterschied.

Das männliche Geschlecht ist etwas häufiger betroffen [14]. Die Erkrankung trifft demnach Menschen in den produktivsten und aktivsten Jahren ihres Lebens. Dies bedeutet sowohl große persönliche Einschnitte und Kosten für den Patienten als auch für das Gesundheitssystem und die Gesellschaft [14,15]. Neben den direkten Kosten durch Medikamente, Arztbesuche, Operationen usw. sind auch indirekte Kosten wie Arbeitsausfälle zu beachten. Nach einer Studie von Stark aus dem Jahre 2006 verursachen indirekte Kosten, die dem Patienten nicht erstattet werden, vermutlich ungefähr die Hälfte aller Kosten [16].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

1.1.2.1 Pathogenese

Die Pathogenese der Colitis ulcerosa ist in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung gewesen, vollständig aufgeklärt wurde sie jedoch bis heute nicht.

Vieles weist darauf hin, dass eine komplexe Störung der mukosalen Barrierefunktion in genetisch-prädisponierten Individuen, kombiniert mit einer unkontrollierten immunologischen Immunantwort gegen luminale Antigene, eine entscheidende Rolle spielen. Bei der Colitis ulcerosa handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, bei der Umweltfaktoren (Rauchen, Ernährungsfaktoren, Hygiene), Wirtsfaktoren (genetische Faktoren), eine dysregulierte Immunantwort und bakterielle Faktoren (Dysbiose) zusammenwirken [15,17]. Die mukosale Barriere der Darmwand stellt den ersten mechanischen Schutz des Gastrointestinaltraktes vor Angriffen von außen dar.

Sie besteht aus einer Epithelschicht und dem antibakteriellen Mukus, welcher Becherzell-Muzine und von Epithelzellen sekretierte intrinsische Peptide (Defensine) enthält. Patienten mit Colitis ulcerosa weisen eine dünnere, defekte Mukusschicht auf, welche im Gegensatz zu gesunden Individuen Bakterien enthält [18]. Vermutlich folgt einer ersten

Läsion der Mukosa des Rektalbereiches eine inadäquate Immunantwort bei genetisch prädisponierten Patienten [19]. Eine solche Läsion kann durch gastrointestinale Infekte verursacht werden und einen Entzündungsprozess initiieren. So verdoppeln gastrointestinale Infekte, beispielsweise mit Shigellen, das Risiko an Colitis ulcerosa zu erkranken [20,21]. Apikale Tight-Junction-Proteine, insbesondere sogenannte Claudine, spielen eine Schlüsselrolle für die Erhaltung der Barrierefunktion und die Kontrolle der parazellulären Permeabilität [22]. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa wurde eine höhere Expression des porenbildenden Claudins 2 in Kolonbiopsien nachgewiesen. Auch die Claudine 1, 2, 12 und 18 zeigten eine erhöhte Expression in Biopsien von Patienten mit Colitis ulcerosa, was zu einem Barrieverlust führt [23]. Es ist jedoch nicht klar, ob die Veränderungen in den Tight-Junction-Proteinen kausal zu einer Barrierestörung und dysregulierten Immunantwort führen oder ob die Entzündung selbst eine Veränderung in der Tight-Junction-Proteinexpression bewirkt [24].

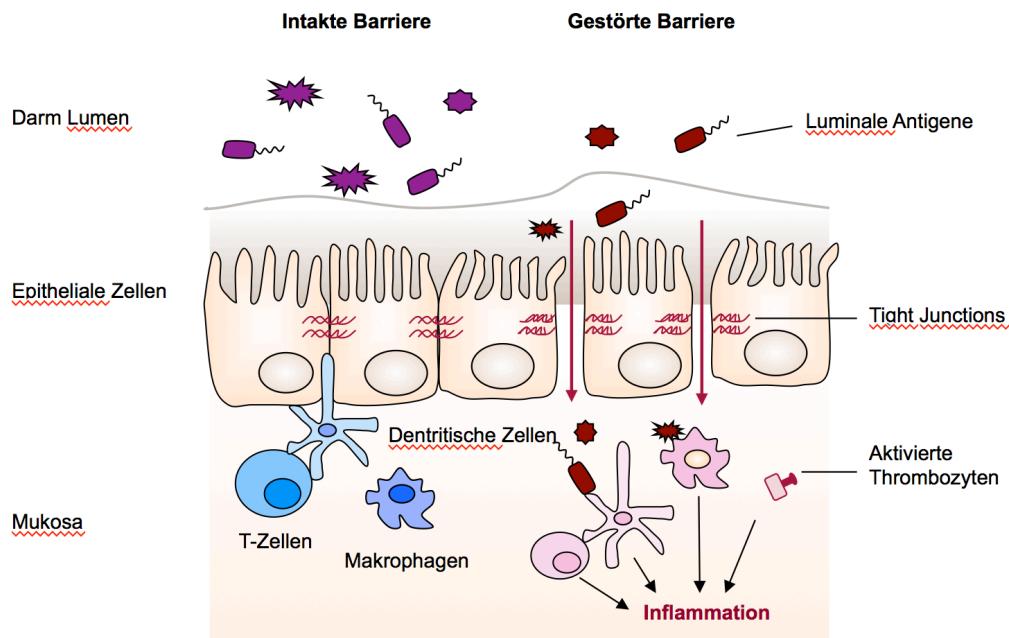


Abb. 1: Pathogenese der Colitis ulcerosa auf mukosaler Ebene nach Waitz et al. [25]: Antigene passieren gestörte Tight Junctions und aktivieren in der Mukosa Thrombozyten und Immunzellen wie T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen. Es folgt eine inadäquate Immunantwort in genetisch prädisponierten Patienten.

1.1.2.2 Multifaktorielle Einflüsse

Viele verschiedene Faktoren fungieren als Trigger oder Protektoren in der Pathogenese der Colitis ulcerosa. Nikotinkonsum schützt vor Schüben und reduziert die Schwere der Erkrankung, einen Einfluss auf den natürlichen Verlauf scheint er nicht zu haben [10]. Patienten, die das Rauchen vor Start der Erkrankung beendeten, hatten ein um bis zu

70% höheres Risiko, an Colitis ulcerosa zu erkranken [26]. Zwei randomisierte, placebo-kontrollierte Studien zeigten, dass Patienten hinsichtlich des klinischen Befindens von einer transdermalen Nikotintherapie profitieren [27]. Eine Erklärung dieses Effektes steht bisher noch aus, es werden z. B. immunmodulatorische Einflüsse diskutiert. Veränderungen auf hormoneller Ebene, in der Zytokin- und Eicosanoidexpression, Permeabilität und Beweglichkeit des Darms und Mukosabeschaffenheit spielen vermutlich ebenfalls eine Rolle [28]. Ein erhöhter Stresspegel scheint mit Rezidiven im Krankheitsverlauf assoziiert zu sein, eine psychologisch therapeutische Intervention konnte in einer Studie jedoch keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf zeigen [29].

Der frühkindlichen Entwicklung des gastrointestinalen Immunsystems kommt vermutlich eine große Bedeutung zu. So konnte nachgewiesen werden, dass Stillen einen protektiven Effekt aufweist, der besonders deutlich bei Stillzeiten von zwölf Monaten und länger imponiert. Die Inzidenz der Colitis ulcerosa ist in Ländern mit einem wachsenden westlichen Lebensstil in den letzten Jahren stark gestiegen, was auf einen Zusammenhang mit der Ernährungsweise schließen lässt. Die Ernährung wird auch von Patientenseite oft thematisiert. Bis heute gibt es keine klare Empfehlung für eine spezielle Diät [30]. Die Durchführung von aussagekräftigen Studien hierzu ist schwierig, da Kontrollgruppen fehlen und die Ernährungsweise individuell sehr unterschiedlich sein kann [31]. Studien zeigten des Weiteren, dass die Einnahme von oralen Kontrazeptiva das Risiko für die Ausbildung einer Colitis ulcerosa erhöht. Die Ursache dafür ist vermutlich die Beeinflussung der intestinalen Permeabilität und endogener Hormone durch orale Östrogene [32].

1.1.2.3 Genetische Faktoren

Als größter Risikofaktor, um an der Colitis ulcerosa zu erkranken, gilt eine positive Familienanamnese. Dies weist auf einen erheblichen genetischen Einfluss hin. So haben 5,7 – 15% der Patienten mit Colitis ulcerosa einen Krankheitsfall in der erstgradigen Verwandtschaft. Bei Ashkenazi Juden ist das Risiko, an Colitis ulcerosa zu erkranken, drei- bis fünfmal höher als in anderen ethnischen Gruppen [14]. Probert et al. zeigten 1993, dass bei europäischen Patienten mit einem Krankheitsfall bei Verwandten ersten Grades, das Risiko ebenfalls zu erkranken, um ein Fünfzehnfaches erhöht ist [33].

Die Identifikation von Markergenen und ihres Einflusses auf biologische Prozesse, die zur Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen führen, spielt eine wichtige Rolle für die Aufklärung des Krankheitsmechanismus [34]. Die Entwicklung der Colitis ulcerosa ist mit 47 Suszeptibilitätsloci assoziiert, davon werden 28 Gen-Loci auch mit der Entstehung des Morbus Crohn in Verbindung gebracht. Beispiele für gemeinsame Suszeptibilitätsloci sind Gene für die Interleukine (IL) 10 und 23 sowie für den Janus-Kinase Weg [35]. Das Überschneiden der Gen-Loci deutet auf einen teilweise

gemeinsamen Pathomechanismus beider Erkrankungen hin. Die bisher bekannten Risikoloci zeigen interessanterweise zu 75% eine Übereinstimmung mit Risikoloci anderer Autoimmunkrankheiten [36]. Für die Colitis ulcerosa typische Suszeptibilitätsloci kodieren u. a. für epitheliale Zell-Adhäsions Moleküle (Hepatozyten Nuclear Faktor 4alpha, CDH1 und Laminin beta1). Dies betont die Rolle der defekten mukosalen Barriere in der Pathogenese der Colitis ulcerosa [37]. Inwieweit das Erkrankungsalter genetisch beeinflusst wird, ist umstritten. Cutler und Mitarbeiter konnten 2015 keine spezifischen Gen-Varianten ermitteln, die eine frühe Manifestation der Erkrankung determinieren [38]. Eine Studie mit saudischen Patienten hingegen zeigt, dass ein Polymorphismus im Apolipoprotein E mit dem Risiko, früh an einer chronischen-entzündlichen Darmerkrankung zu erkranken, assoziiert ist [39]. Connelly und Mitarbeiter wiesen nach, dass eine Mutation im LAMB-1-Gen, welches für ein Basalmembran-Protein kodiert, mit einem Diagnosealter < 16 Jahren assoziiert ist [40]. Eine Studie von Hayes identifizierte die ersten missense-Mutationen in den Genen NOX1 und DUOX2, welche eine Assoziation mit einem frühen Erkrankungsalter aufwiesen [41].

1.1.2.4 Epigenetische Faktoren

MikroRNAs (miRNAs) sind kurze, einzelsträngige, hoch konservierte, nichtkodierende RNAs, welche die Genregulation posttranskriptionell beeinflussen. Sie sind an vielen biologischen Prozessen, wie beispielsweise Zellproliferation, Zelldifferenzierung oder Signaltransduktion beteiligt und spielen eine Rolle im angeborenen und erworbenen Immunsystem. Eine veränderte Expression von miRNAs ist in verschiedenen Autoimmunkrankheiten wie Rheumatoide Arthritis, Lupus erythematosus oder Asthma bronchiale bekannt. Eine veränderte Expression von mehr als 100 miRNAs wurde in Gewebe- und Blutzellen von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu Gesunden beschrieben [42]. Schäfer et al. suggerieren in einer Veröffentlichung aus dem Jahre 2015, dass es spezifische miRNA Muster für die Colitis ulcerosa und den Morbus Crohn in verschiedenen Substanzen (Kolon, Blut, Speichel) gibt. Diese miRNAs könnten als Marker benutzt werden, um chronisch-entzündliche Darmrankungen zu diagnostizieren und zwischen Colitis ulcerosa und M. Crohn zu differenzieren [43]. Sofern es gelingen sollte, die Rolle von miRNAs weiter zu entschlüsseln, könnte dies zu neuem Verständnis der Pathogenese und neuen Möglichkeiten bezüglich Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa führen [44].

1.1.2.5 Gastrointestinales Immunsystem

Die verbesserte Hygienesituation in industrialisierten Nationen führt zum verminderten Auftreten von Magen-Darm-Infektionen während der Kindheit. Dies verursacht vermutlich eine verminderte Entwicklung des mukosalen Immunsystems und so möglicherweise

eine Prädisposition für die Colitis ulcerosa [45]. Das gastrointestinale Immunsystem ist komplex. Einen ersten unspezifischen Schutz bilden antimikrobielle Peptide wie Defensine und Cathelicidine. Für die Produktion von Defensinen sind Epithelzellen und insbesondere die Panethschen Körnerzellen in den Krypten der Darmschleimhaut verantwortlich. Diese Zellschichten sind, bedingt durch eine verringerte Muzin-2-Synthese, bei Patienten mit einer Colitis ulcerosa wesentlich dünner als bei gesunden Patienten [46]. Bakterien und luminale Antigene können die Mukus- und Epithelschicht durchdringen und dabei die Aktivierung zahlreicher Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems induzieren. Luminale Antigene aktivieren das angeborene Immunsystem über Interaktionen mit Makrophagen und dendritischen Zellen.

Diese bevölkern neben Mastzellen und Granulozyten die Lamina propria im Kolon und präsentieren die Antigene an B- und T-Zellen, welche wiederum das erworbene Immunsystem aktivieren. Bei Colitis ulcerosa Patienten ist sowohl die Anzahl der aktivierte und reifen dendritischen Zellen als auch deren Leistungsfähigkeit erhöht.

Die Anzahl der zirkulierenden dendritischen Zellen korreliert mit der Krankheitsaktivität, was auf eine bedeutende Rolle dieser Zellen für den Beginn und Verlauf der Krankheit hinweist [47]. Dendritische Zellen stellen Membranrezeptoren her, die unter dem Begriff Pattern-Recognition Receptors (PRRs) zusammengefasst werden und ausschließlich Strukturen erkennen, die auf oder in Krankheitserregern vorkommen (Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)). Beispiele sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs) und NOD-Like Rezeptoren. Diese TLR können eine augenblickliche Immunantwort gegen Verletzungen oder andere Angriffe auf den menschlichen Organismus initiieren. Außerdem tragen TLRs zur intestinalen Homöostase und Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere bei. Die TLR4-Expression ist in der Lamina Propria von Patienten mit Colitis ulcerosa stark erhöht und könnte eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen [48]. Polymorphismen der TLRs könnten die Anfälligkeit für Infektionen erhöhen oder die Akzeptanz des Immunsystems auf kommensale Bakterien verändern. Während beim Morbus Crohn vor allem TH1-vermittelte Immunantworten stimuliert werden, wurde die Colitis ulcerosa eher mit einer TH2-Zell-vermittelte Immunreaktion in Verbindung gebracht [49]. Die Ergebnisse einer Studie von Ebrahimi Daryani et al. aus dem Jahre 2017 suggerieren, dass IL-4 Polymorphismen eine bedeutende Rolle in der Prädisposition für CED spielen [50]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass vor allem das IL-13, welches vermehrt von Natürlichen Killer T-Zellen (NKT-Zellen) in der Lamina propria von Patienten mit Colitis ulcerosa gebildet wird, eine Bedeutung für die Immunpathogenese der Colitis ulcerosa hat. IL-13 induziert Apoptose in Epithelzellen, steigert die Permeabilität der Tight-Junctions zwischen intakten Zellen und schwächt dadurch deutlich die Barrierefunktion der Epithelzellen [49]. Matusiewicz et al. konnten zeigen, dass die systemische Konzentration von IL-9 bei CED-Patienten erhöht ist und mit dem Grad der

endoskopisch darstellbaren Entzündung korreliert [51]. Zusammenfassend sind eine Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , interleukin IL-6, IL-9 IL-13, IL-17, IL-18 Und IL-21) und anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10, IL-11 und transforming growth factor β) Zielstrukturen von neuen therapeutischen Ansätzen in der Immunregulation [52].

1.1.2.6 Rolle der Thrombozyten

In den letzten Jahren wurde erkannt, dass Thrombozyten in der Pathogenese der Colitis ulcerosa eine wesentliche Rolle spielen. So ist bei Colitis-ulcerosa-Patienten die Anzahl der Thrombozyten im Blut erhöht und korrelierend mit der Krankheitsaktivität [53].

Die Thrombozyten sind in ihrer Funktion abnormal - unabhängig davon, ob die Erkrankung aktiv oder inaktiv ist [54]. Aktivierte Thrombozyten wurden sowohl im systemischen als auch im mesenterialen Blutkreislauf sowie in der intestinalen Mukosa nachgewiesen [55, 56].

Neben der Zahl der Thrombozyten ist auch der Anteil der Thrombozytenaggregate bei Patienten mit Colitis ulcerosa erhöht, sogar in der inaktiven Phase der Erkrankung [57]. Auch die Konzentration des von Willebrand-Faktors (vWF), der Gerinnungsfaktoren V, VII, VIII, IX, X und des Thrombins ist bei Patienten mit Colitis ulcerosa erhöht [54].

Die antikoagulatorischen Mediatoren Antithrombin und Protein S weisen dagegen eine geringere Konzentration auf. Die Konzentration des Protein C zeigt sich unverändert.

Des Weiteren wurden hohe Konzentrationen an Fibrinogen, Fibrin, Fibrinogen-Spalt-Produkten und D-Dimeren in Kohorten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen festgestellt [54]. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen die Koagulationskaskade kontinuierlich aktiviert ist. Mikrovaskuläre Thromben und mikrozirkuläre Dysfunktionen sind die Folge [58]. Das Risiko, ein thromboembolisches Ereignis wie eine Thrombose oder eine Lungenarterienembolie zu erleiden, ist bis zu dreimal höher als bei Gesunden [59]. Thromboembolismus ist einer der Hauptgründe für Morbidität und Mortalität bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Thrombozyten wirken neben ihrer Funktion bei der Wundreparatur auch bei Entzündungsprozessen, der Angiogenese und Atherosklerose, mit. Dies zeigt, dass Thrombozyten eine multifaktorielle Rolle in der Physiologie des Menschen und auch in der Pathogenese der Colitis ulcerosa spielen. Hier könnten aktivierte Thrombozyten das fehlende Verbindungsstück zum Verständnis der Rolle von Entzündung und Koagulation bei der Colitis ulcerosa sein. Beide Prozesse scheinen sich gegenseitig zu fördern [60]. Ein neu entdeckter Faktor bezüglich der Rolle von Thrombozyten in der Pathogenese der Colitis ulcerosa ist der Eisenmangel, der im Ausmaß mit der Thrombozytenzahl und Krankheitsaktivität korreliert [61]. Das Auffüllen des Eisenspeichers kann zu einer Normalisierung der Thrombozytenwerte führen [62].

Doch nicht nur Thrombozyten selbst, sondern auch von Thrombozyten produzierte Zellen und Partikel wie Mikropartikel, Selektine oder der CD40-Ligand scheinen relevant für die Pathogenese der Colitis ulcerosa zu sein.

1.1.2.7 Mikropartikel

Mikropartikel sind 0,1-1,0 μm große Fragmente, die von der Thrombozytenmembran, aber auch von der Membran anderer Zellen bei Stress, Aktivierung oder Apoptose abgeschnürt werden. Sie bestehen aus Phospholipiden, tragen verschiedene Rezeptoren und das prokoagulatorisch-wirksame Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche. Mikropartikel, die von Thrombozyten abstammen, ergänzen die Funktionen von Thrombozyten in Hämostase, Gewebsregulierung und Entzündungen [63]. Auch bei Patienten mit Colitis ulcerosa bilden Thrombozyten verstärkt Mikropartikel. Dabei zeigt sich eine Korrelation zur Krankheitsaktivität. Bei Remission ist die Zahl rückläufig [64]. Durch die prothrombotische Wirkung der Mikropartikel haben Patienten ein zwei bis dreifach erhöhtes Risiko, an einer Thrombose zu erkranken [65]. Auch andere Zellen schnüren Mikropartikel ab. Ihre genauen Funktionen sind bis heute unbekannt. Sie spielen vermutlich eine Rolle bei Entzündungsprozessen und der Modulation von endothelialen Zellen [66].

1.1.2.8 Lösliches P-Selektin (sP-Selektin)

Selektine sind membranständige Glykoproteine bzw. Zelladhäsionsmoleküle, welche spezielle Kohlenhydratgruppen binden und auf dem Gefäßendothel (E-Selektin und P-Selektin), auf Thrombozyten (P-Selektin) und Leukozyten (L-Selektin) exprimiert werden. Die Infiltration der intestinalen Lamina propria mit Neutrophilen Granulozyten ist ein typisches Merkmal der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Durch erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothel und Leukozyten wird eine verstärkte Extravasation dieser Zellen in das entzündete Gewebe hervorgerufen.

Die Konzentration löslicher P-Selektine (sP-Selektine) ist im Blut von Patienten mit Colitis ulcerosa signifikant erhöht. Eine kurzzeitige Blockade mit anti-PSGL-1-Antikörpern kann den Transport von Neutrophilen unterbinden und die Krankheitsaktivität verringern [67]. Die Konzentration von sP-Selektin steigt entsprechend der Schwere der Erkrankung.

Sie korreliert auch mit der Anzahl von Mikropartikeln aus Thrombozyten [64].

Khazen et al. wiesen eine Assoziation der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen mit dem Allel L206 des L-Selektin-Gens nach [68]. Auch andere Selektine spielen vermutlich eine Rolle in der Pathogenese der Colitis ulcerosa. So könnte die Expression von E-Selektin auf Endothelzellen Zeichen eines Rückfalls nach Remission sein [69].

1.1.2.9 CD40-Ligand

Der CD40-Ligand (CD40L, CD154) ist ein kostimulatorisches Molekül und gehört zur TNF-Rezeptor-Superfamilie. Er wird von aktivierten T-Zellen und Thrombozyten exprimiert und sezerniert (sCD40L). Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen weisen höhere sCD40L-Plasmaspiegel auf als gesunde Patienten [70, 71] und korrelieren dabei in Ihrer Konzentration mit der Krankheitsaktivität [72]. Entscheidende Signalgeber für die Expression sind IF- γ und TNF- α . CD40L wird vom CD40-Antigen gebunden, ein kostimulatorisches Protein, welches auf Antigen-präsentierenden Zellen wie B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen sowie Fibroblasten und basalen Epithelzellen exprimiert wird. Die Interaktion von CD40 mit CD40L fördert die Koagulation durch vermehrte Freisetzung des Tissue factor aus Endothelzellen und Monozyten.

Dies wiederum steigert das Risiko venöser Thrombosen und thromboembolischer Ereignisse [54]. Des Weiteren führt die Bindung von CD40 auf B-Zellen zur Antikörperproduktion [73]. Die Blockade des CD40-CD40L Komplexes könnte demnach einen therapeutischen Effekt ausüben [74].

1.1.3 Klinik

Blutige, schleimige Durchfälle sind das Leitsymptom der Colitis ulcerosa. Die weitere Klinik ist bestimmt durch Fieber, Anämie, Inkontinenz und krampfartige Abdominalschmerzen, vor allem im linken Unterbauch vor der Defäkation. Der Stuhlgang ist hochfrequent und niedervoluminös als Reaktion auf die rektale Entzündungsreaktion. Auch eine spastische Obstipation ist möglich [75]. Schreitet der Krankheitsverlauf voran, ist auch mit systemischen Folgen wie Anämie, Eiweißverlust, Dehydratation, Mangelernährung und bei Kindern mit Wachstumsstörungen zu rechnen [76]. Zur Aktivitätsbeurteilung der Colitis ulcerosa gibt es bisher keinen einheitlich verwendeten Standard. Truelove & Witts [11] schlugen 1955 eine Klassifikation vor, die heute noch verwendet wird (Tab. 1):

Tab. 1: Krankheitsaktivität der Colitis ulcerosa nach Truelove & Witts [11]

	Milder Verlauf	Moderater Verlauf	Schwerer Verlauf
Blutige Stühle / Tag	< 4	4 - 5	> 5
Puls (Schläge / min)	< 90	< 90	> 90
Temperatur in °C	< 37,5	< 37,9	> 38
Hämoglobin	> 11,5	> 10,4	< 10,4
BSG	< 20	< 31	> 30
CRP	Normal	< 31	> 30

Neben einer Reihe weiterer Scores ist der Mayo-Score [77] ein in der Klinik sehr häufig angewandter Score, welcher den endoskopischen Befund mit berücksichtigt (Tab. 2).

Bei diesem Score erhält eine Remission weniger als zwei Punkte, ein milder Verlauf drei bis fünf Punkte, ein moderater Verlauf sechs bis zehn Punkte und ein schwerer Verlauf elf bis zwölf Punkte.

Tab. 2: Mayo-Score zur Aktivitätsbeurteilung der Colitis ulcerosa [77]

Punkte	Stuhl frequenz	Blut im Stuhl	Allgemeine Einschätzung	Endoskopie
0	Normal	Keines	Keine Aktivität	Normal
1	1-2 mehr als normal	Wenig (bei weniger als 50%)	Milde Aktivität	Erythem, gestörte Gefäßzeichnung, Verletzung, körnige Beschaffenheit
2	3-4 mehr als normal	Mittel (bei mehr als 50%)	Moderate Aktivität	Deutliches Erythem, fehlende Gefäßzeichnung, Verletzlichkeit, Erosionen, eitriger Schleim
3	> 4 mehr als normal	Nur Blut	Schwere Aktivität	Ulzerationen, eitriger Schleim, Spontanblutung

In dieser Anwendungsbeobachtung wurde der klinische Aktivitätsindex nach Rachmilewitz zur Evaluierung der Krankheitsaktivität verwendet, der in Tabelle 3 dargestellt wird:

Tab. 3: Klinischer Aktivitätsindex nach Rachmilewitz [78].

Anzahl der Stühle / Woche	< 18 = 0	18 bis 35 = 1	36 bis 60 = 2	> 60 = 3
Blut im / auf dem Stuhl	kein = 0	wenig = 2	viel = 4	
Allgemeinbefinden	gut = 0	mäßig = 1	schlecht = 2	sehr schlecht = 3
Bauchschmerzen	keine = 0	leicht = 1	mäßig = 2	stark = 3
Fieber infolge der Kolitis	37 = 0	> 38 = 3		
Extraintestinale Manifestationen	Iritis = 3	Erythema nodosum = 3	Arthritis = 3	
Laborbefunde	BSG > 50mm = 1	> 100mm = 2	Hb < 10g = 4	
Klinischer Aktivitätsindex (CAI) =				

Der klinische Aktivitätsindex nach Rachmilewitz erstellt einen Punktewert auf Basis des klinischen Befindens, extraintestinaler Manifestationen und Laborwerten. Eine Summe der erhobenen Punkte (CAI) über fünf Punkte gilt als Beleg für einen aktiven Status der Erkrankung. Die Klinische Remission ist definiert mit einem CAI \leq vier Punkte – klinisches Ansprechen als ein Abfall von drei Punkten bzw. \leq vier Punkten [78].

1.1.3.1 Extraintestinale Manifestationen und Komplikationen

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind Systemerkrankungen und nicht nur auf den Darm in ihrer Manifestation beschränkt. Bis zu 50% der CED-Patienten leiden an extraintestinalen Manifestationen, die beinahe in jeder Körperregion auftreten und die Lebensqualität stark einschränken können. Oft erfolgt die Diagnose extraintestinaler Manifestationen schon vor der eigentlichen Darmentzündung [79]. Im Kindesalter muss mit Wachstumsstörungen und Mangelernährung gerechnet werden. Die Primärsklerosierende Cholangitis (PSC) oder Thrombosen können nicht nur die Lebensqualität einschränken, sondern das Leben sogar gefährden. Die europäische Organisation für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (ECCO) hat in einem Konsensuspapier die häufigsten extraintestinalen Manifestationen und deren Pathogenese und Therapie zusammengestellt [80]. Extraintestinale Manifestationen treten bei der Colitis ulcerosa im Vergleich zum Morbus Crohn prinzipiell seltener auf. Eine Ausnahme bilden Lebererkrankungen wie die PSC [81, 82]. Die Wahrscheinlichkeit, eine extraintestinale Manifestation zu entwickeln, steigt dabei mit der Krankheitsdauer und zuvor erlittenen Manifestationen an [83]. Die Leber ist am häufigsten von extraintestinalen Manifestationen betroffen. Bis zu 30% der Patienten haben erhöhte Leberwerte [84]. Die PSC ist dabei die häufigste Erkrankung. Die Gallengänge werden durch die Entzündung zerstört, was mit einer Leberinsuffizienz und einem erhöhten Risiko für Cholangiokarzinome einhergeht [85]. Patienten mit Colitis ulcerosa haben ein 1,5-2 mal erhöhtes Risiko, an einer akuten Pankreatitis zu erkranken. Dies wird durch Autoimmunvorgänge, medikamentös-toxische Prozesse, aber auch durch manuelle Therapieoptionen wie der ERCP (Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie) beeinflusst [86]. Die Prävalenz von Arthritiden liegt je nach Studie bei ca. 18%. Die Prognose ist generell gut, nur sehr wenige Patienten erleiden eine chronische oder erosive Form [87]. Die Hälfte der CED-Patienten weist eine signifikante Reduktion der Knochenmasse auf [88]. Die Inzidenz der okulären Manifestationen liegt zwischen 4-12%. Die anteriore Uveitis und die Episkleritis sind am häufigsten. Beachtet werden muss, dass die Augen nicht nur durch die Erkrankung selbst, sondern auch sekundär durch Medikamente wie Steroide oder Budesonid angegriffen werden können [89]. Als extraintestinale Manifestationen der Haut treten bei Patienten mit Colitis ulcerosa das Erythema nodosum und das Pyoderma gangraenosum auf.

Die Prävalenz des Erythema nodosum liegt zwischen 4,2 – 7,5% und tritt verstärkt bei Frauen auf. Etwa 0,6-2,1% der Patienten entwickeln ein Pyoderma gangraenosum [90, 91]. Circa 60% der Patienten leiden an sexuellen Dysfunktionen. Vor allem Patienten mit einem höheren Schweregrad der Erkrankung, weiblichen Geschlechtes und mit Depression sind betroffen [92]. Eine große Metaanalyse mit über 200.000 Patienten konnte keine größere kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit Colitis ulcerosa feststellen [93]. Demgegenüber werden in dem Konsensuspapier mehrere kleine Studien genannt, die ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko zeigen [80].

1.1.4 Diagnostik

1.1.4.1 Diagnostik nach aktualisierter deutscher Leitlinie 2018 und dem ECCO Consensus-Papier 2017

Die Diagnose einer Colitis ulcerosa wird aufgrund klinischer, laborchemischer, endoskopischer, radiologischer und pathomorphologischer Befunde gestellt.

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es noch keinen Goldstandard. Nach den Empfehlungen der aktualisierten Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa aus dem Jahr 2018 [94] soll die Anamnese zu Beginn eine intensive Befragung über Beginn und Art der Symptome, Impfstatus, Raucheranamnese, Kontakte mit infektiösen Durchfall- erkrankungen, Nahrungsmittelunverträglichkeiten, eine jüngere Reiseanamnese sowie Medikamenten- und Familienanamnese beinhalten. Eine infektiöse Genese – v.a. mit *C. difficile* oder CMV-assoziiert – sollte ausgeschlossen werden [10]. Des Weiteren soll die Anamnese Fragen bezüglich extraintestinaler Manifestationen beinhalten. Sonographisch können Entzündungen des Gastrointestinaltraktes mit einer Sensitivität bis zu 90% ermittelt werden. Jedoch sind die Ergebnisse sehr von den Fähigkeiten und Erfahrungswerten des Untersuchers abhängig. Ein Ausschluss der Erkrankung ist gar nicht [95], die Differenzierung zwischen Colitis ulcerosa und anderen entzündlichen Prozessen nur selten sicher möglich [96]. Im Verlauf der Erkrankung kann ein erfahrener Gastroenterologe jedoch das Therapieansprechen mittels Sonographie verfolgen und beurteilen. Zeichen einer akuten Entzündung sind eine Verdickung der Darmwand, eine aufgehobene Darmwandschichtung sowie vergrößerte Lymphknoten. Vor allem eine Verdickung der Darmwand ist von Bedeutung. So korreliert die Darmwanddicke mit der klinischen und endoskopischen Krankheitsaktivität [97]. Eine Hyperperfusion als Zeichen einer Entzündung kann duplexsonographisch dargestellt werden [98]. Bei spezifischem Verdacht auf eine Colitis ulcerosa soll daher eine komplette körperliche Untersuchung inklusive oraler und perianaler Inspektion, der Beachtung extraintestinaler Manifestationen und eine endoskopische Klassifizierung erfolgen [94]. Differentialdiagnostisch sollte bei einer positiven Reiseanamnese an eine parasitäre Genese oder generell an eine CMV-

Enteritis gedacht werden. Die deutschen Leitlinien empfehlen, bei der Erstdiagnose aus dem terminalen Ileum und aus allen Kolonabschnitten unter Einbeziehung des Rektums Stufenbiopsien zu gewinnen. Bei Zweifel bezüglich der Diagnose sollte die Endoskopie inklusive Histologiegewinnung im Intervall nach 3-6 Monaten wiederholt werden [94].

Der Gebrauch venöser und oraler Kontrastmittel im Magnet- resonanztomographen bereichert die diagnostischen Möglichkeiten zusätzlich [99]. Die Abgrenzung einer Colitis ulcerosa zum Morbus Crohn und anderen entzündlichen Darmerkrankungen erfolgt aufgrund der endoskopischen und histologischen Beurteilung, vor allem in Bezug auf das Ausmaß der Entzündung und der topografischen Verteilung. Die Colitis ulcerosa zeigt meist eine von rektal ausgehende, kontinuierliche mukosale Entzündung, die im Verlauf nach proximal variiert. In bis zu 20% der Fälle entzündet sich das Ileum (sog. „Backwash Ileitis“), meist ist nur das Kolon betroffen [100].

Es gibt jedoch auch Varianten mit rektalen Aussparungen der Entzündungen [10].

Endoskopische Verlaufskontrollen sollen nicht routinemäßig – sondern in begründeten Fällen wie beispielweise therapierefraktären Verläufen erfolgen [94].

Histologische Veränderungen können in vier Hauptkategorien unterteilt werden: die mukosale Architektur, die Zellbeschaffenheit der Lamina propria, der Infiltration durch neutrophile Granulozyten und epitheliale Abnormalitäten. Es zeigen jedoch lediglich 20% der Patienten histologische Veränderungen in den ersten 14 Tagen der Erkrankung.

Das früheste Merkmal der Erkrankung mit dem höchsten prädiktiven Wert ist dabei die basale Plasmozytose [10]. Der histologische Nachweis der Krankheitsaktivität hat eine wesentliche Bedeutung für die Diagnose und die Behandlung. Die bisher bekannten Scoring-Systeme wie der Geboes-Score [101] oder der Modifizierte Riley Score [102] sind etabliert, werden aber oft in der Klinik nicht angewendet. Mosli et al. haben 2015 einen neuen Score entwickelt, den sogenannten Robarts Histopathologischen Index (RHI), welcher mit Fokus auf die Histopathologie eine Ergänzung zu bisherigen Scores sein soll. Komponenten des RHI sind chronisch inflammatorische Infiltrate, Neutrophile Granulozyten in der Lamina propria/im Epithel und Erosionen bzw. Ulzerationen [103].

1.1.4.2 Labordiagnostik

Die initiale Labordiagnostik sollte neben dem Blutbild den Entzündungsstatus, den Eisenhaushalt, die Nierenfunktion, Transaminasen und Cholestaseparameter beinhalten. Von besonderer Bedeutung ist die Konzentration des C-Reaktiven Proteins (CRP), da dieses mit dem Ausmaß der Erkrankung korreliert [104]. Dies trifft jedoch nicht auf die Proktitis zu. Ein normaler CRP-Wert schließt das Vorliegen einer aktiven Colitis ulcerosa nicht aus. Weitere Marker für eine klinische und endoskopische Entzündungsaktivität bei Patienten mit Colitis ulcerosa sind Laktoferrin und Calprotectin – insbesondere in der Abgrenzung zur funktionellen Reizdarmsymptomatik. Andere Marker wie Elastase und

S100A12 haben ebenfalls ihre Akkuranz bei der Detektion von Darmentzündungen bewiesen [10, 105]. Das fäkale Calprotectin korreliert am stärksten mit der endoskopischen Krankheitsaktivität, gefolgt vom klinischen Aktivitätsindex (CAI), dem CRP und den Leukozyten und sollte zur Verlaufsdiagnostik herangezogen werden. Darüber hinaus ist das fäkale Calprotectin der einzige Marker, mit dessen Hilfe die Krankheitsaktivität in inaktiv, mild, moderat und hochaktiv unterteilt werden kann [106]. Da fäkale Marker nicht dafür geeignet sind, zwischen verschiedenen Ursachen einer intestinalen Entzündung zu unterscheiden, ist ihr Nutzen für die Primärdiagnostik limitiert. Sie kommen jedoch für die Früherkennung von Rezidiven in Betracht. Eine Bestimmung von perinukleären anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern (pANCA) kann im Einzelfall für die Diagnosestellung hilfreich sein, muss wegen der niedrigen Sensitivität jedoch kritisch beurteilt werden [11].

1.1.5 Therapie der Colitis ulcerosa

1.1.5.1 Therapie nach aktualisierter deutscher Leitlinie 2018 und dem ECCO Consensus-Papier 2017

Das grundlegende Behandlungsziel der Colitis ulcerosa ist das rasche Erreichen einer klinischen Remission und die Bewahrung einer langfristigen steroidfreien klinischen und endoskopischen Remission [94]. Diese ist nicht einheitlich definiert: Die ECCO-Konsensus Gruppe spricht von einer Remission bei einer Stuhlfrequenz von weniger als dreimal pro Tag, keinen rektalen Blutabgängen und einer endoskopisch normal imponierenden Mukosa [10].

Die Art der medikamentösen Therapie richtet sich nach der Lokalisation der Entzündung, der Entzündungsaktivität und dem Ansprechen auf Steroide. Nach der Montreal-Klassifikation [107] wird das Befallsmuster der Erkrankung folgendermaßen eingeteilt:

E1: Proktitis - limitiert auf das Rektum distal des rektosigmoidalen Überganges

E2: Linksseitenkolitis bei Befall bis zur linken Flexur

E3: Ausdehnung über die linke Flexur hinaus bis zur Pankolitis.

Die Montreal-Klassifikation hat Einfluss auf den Einsatz topisch und/oder systemisch wirkender Medikamente sowie auf die Karzinomvorsorge. Gemäß der Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa aus dem Jahr 2018 [94] soll die Colitis ulcerosa wie folgt nach dem Eskalationsprinzip behandelt werden.

Von besonderer Bedeutung ist es dabei, die Patienten zu selektieren, die einer stationären Therapie bedürfen. Eine leichte Proktitis sollte zunächst mit Mesalazin \geq 1000mg/d als Suppositorium einmal täglich therapiert werden. Die gute Wirksamkeit dieses Medikamentes konnte in mehreren Studien belegt werden [108]. Höhere Dosen zeigen meist keine bessere Wirkung [10]. Eine therapeutische Alternative stellen topisch anzuwendende Mesalazinschäume und -einläufe dar. Suppositorien sind einfach zu

verwenden und setzen den Wirkstoff günstig frei [109, 110]. Des Weiteren werden sie meist von Patienten besser vertragen. Bei Versagen der Monotherapie sollte die rektale Mesalazinanwendung mit topischen Steroiden oder Mesalazin freisetzenden Präparaten kombiniert werden. Neben der medikamentösen Therapie kommt auch der Pflege und Hygiene der Perianalregion eine große Bedeutung zu. Eine therapierefraktäre Proktitis bedarf einer systemischen Therapie mit Steroiden, Immunsuppressiva und / oder Biologicals [10]. Eine linksseitige Colitis ulcerosa der Kategorie E2 sollte mit rektalem 5-ASA in Monotherapie [111] bevorzugt in Kombination mit oralen 5-ASA freisetzenden Präparaten ($\geq 3\text{ g/d}$) behandelt werden. Eine Studie von Safdi et al. konnte zeigen, dass die Kombinationstherapie der Monotherapie überlegen ist [112]. Durch die Kombination werden höhere mukosale 5-ASA-Konzentrationen erreicht [113]. Der Patient sollte innerhalb von zwei Wochen auf die Therapie ansprechen. Eine hohe Compliance der Patienten in Bezug auf die Medikamenteneinnahme ist für den Therapieerfolg von entscheidender Bedeutung. Higgins et al. zeigten, dass ein signifikanter Anteil der Colitis ulcerosa-Schübe und der damit verbundenen medizinischen Kosten auf eine fehlende Therapieadhärenz zurückgeführt werden kann [114]. Bei fehlendem Ansprechen ist die Gabe von systemisch wirkenden Kortikosteroiden indiziert. Bei unzureichendem Ansprechen auf 5-ASA ist Budesonid bei Patienten mit mildem bis moderatem Krankheitsverlauf als weitere Alternative effektiv [115]. Bei ausgedehntem und schwerem Befall der Kategorie E3 soll prinzipiell wie bei einer Linksseitenkolitis therapiert werden. Es erfolgt zunächst eine Behandlung mit einem oralen Mesalazin-freisetzenden Präparat in einer Dosis von $> 3\text{ g/d}$ in Kombination mit Mesalazineinläufen oder -schäumen von 1 g/d . Eine schwere Colitis ulcerosa ist durch eine deutlich erhöhte Stuhlfrequenz und Zeichen einer systemischen Erkrankung gekennzeichnet. Die Behandlung sollte stets stationär und interdisziplinär erfolgen. Des Weiteren sollte ein schwer verlaufender Schub mit Zeichen einer systemischen Beteiligung mit einer systemischen Steroidtherapie (1 mg/kg Körpergewicht Prednisolonäquivalent pro Tag) behandelt werden [94].. Zweitgenerations-Kortikosteroide wie Beclomethason sind wirksame Alternativen zu konventionellen Präparaten [10]. Die Dauer der Gabe richtet sich nach klinischem Verlauf und Ansprechen. Die Steroide sollten innerhalb von 8-12 Wochen jedoch wieder ausgeschlichen werden [98]. Bei einer konstanten Körpertemperaturerhöhung, persistierender blutiger Diarrhoe und erhöhtem CRP am dritten Tag einer Kortikosteroidtherapie muss an einen steroidrefraktären Verlauf gedacht werden [116]. Hier sollte entweder eine zeitige chirurgische Intervention oder eine Therapie mit anti-TNF- α -Antikörpern (Infliximab, Adalimumab, Golimumab) [117] oder den Calcineurin-Inhibitoren Tacrolimus oder Ciclosporin A in Erwägung gezogen werden. Im Falle von Infliximab sollte vorzugsweise eine Kombinationstherapie mit einem Thiopurin eingesetzt werden [94]. Des Weiteren sollte bei schweren Verläufen eine adäquate Volumenzufuhr,

eine Thromboseprophylaxe sowie ggf. eine strenge Einstellung abnormaler Elektrolyte erfolgen [10]. Nach Ansprechen auf eine Therapie mit Calcineurinhibitoren kann eine Therapie mit Azathioprin oder Vedolizumab eingeleitet werden [94]. Mit Vedolizumab (anti- $\alpha 4\beta 7$ -Integrin) ist seit Juli 2014 ein weiteres Biologikum zur Behandlung von erwachsenen Patienten mit mittelschwer bis schwer aktiver Colitis ulcerosa zugelassen worden. Es blockiert spezifisch $\alpha 4\beta 7$, ein Integrin, welches auf T-Lymphozyten exprimiert wird. $\alpha 4\beta 7$ -Integrine binden an das sogenannte „Vascular addressin cell adhesion molecule“ (MAdCAM), welches vorrangig auf mukosalen Endothelzellen exprimiert wird. So inhibiert Vedolizumab die Einwanderung von Lymphozyten in den Darm und somit die weitere Entzündungsreaktion. Für Patienten, die entweder auf konventionelle Therapie oder einen der TNF- α -Antagonisten unzureichend angesprochen haben, nicht mehr darauf ansprechen oder eine Unverträglichkeit gegen eine entsprechende Behandlung aufweisen, ist Vedolizumab eine Alternative [118]. Eine Übersichtsarbeit über Studien mit 2830 mit Vedolizumab therapierten Patienten konnte das gute Nebenwirkungsprofil belegen [119].

Im Rahmen von sog. „Living Guidelines“ hat die DGVS im August 2019 die aktuelle Leitlinie um eine Therapieempfehlung zu dem oralen JAK Inhibitor Tofacitinib ergänzt. Dieser kann bei Versagen der bisherigen Therapie bei der mittelschweren bis schweren Colitis ulcerosa eingesetzt werden [239].

Eine große Bedeutung im Therapiekonzept der Colitis ulcerosa hat die Entscheidung zur richtigen Zeit von einem medikamentösen auf einen chirurgischen Therapieansatz zu wechseln. Diverse Studien kamen zu dem Ergebnis, dass bei einem therapierefraktären fulminanten Schub eine Proktokolektomie nach spätestens 4-7 Tagen und nach nur einem Versuch mit anti-TNF- α -Antikörpern oder Calcineurin-Inhibitoren empfohlen werden sollte [116, 120, 121]. Die restaurative Proktokolektomie mit ileoanal Pouch-Anastomose (IPAA) wird als Standardoperation empfohlen. Über 90% der Patienten lebten nach der Operation mit einem ileoanal Pouch mit durchschnittlich 5-6 Stuhlgängen pro Tag und einer guten Lebensqualität [122, 123]. Die laparoskopische restaurative Proktokolektomie kann als gleichwertige Alternative zur offenen Operation angeboten werden und sollte bei entsprechenden chirurgischen Fähigkeiten bevorzugt werden [10]. Eine Operation kann des Weiteren bei einer Kolonstenose unklarer Dignität und elektiv auf Patientenwunsch erfolgen. Eine freie oder gedeckte Perforation stellt eine Notfallindikation zum operativen Eingriff dar. Empfohlen wird die Kolektomie vor allem bei älteren Patienten über 40 Jahren und bei sehr fortgeschrittenem Krankheitszustand [124]. Aufgrund der neueren medikamentösen Therapieoptionen ist die Zahl der Kolektomien in frühen Krankheitsstadien in den letzten Jahren zurückgegangen [125]. Es muss abschließend bemerkt werden, dass das Evidenz-Niveau der chirurgischen Empfehlungen aufgrund

eines Mangels an randomisierten Studien als niedrig anzusehen ist [10]. Zur Remissionserhaltung empfiehlt sich die Gabe von 5-ASA Präparaten. Bei Mesalazin-Unverträglichkeit kann alternativ *Escherichia coli* Nissle (EcN) eingesetzt werden [94]. Eine Langzeittherapie muss beinahe allen Patienten empfohlen werden.

Eine intermittierender Therapieansatz ist lediglich bei Patienten mit einer Proktitis akzeptabel [10]. Auf Kortikosteroide sollte aufgrund der Nebenwirkungen verzichtet werden [98]. Bei Mesalazin-Resistenz oder Steroid-Abhängigkeit können Azathioprin, 6-Mercaptopurin, anti-TNF- α -Antikörper oder Vedolizumab eingesetzt werden [94]. Aufgrund limitierter Evidenz kann bzgl. der Therapiedauer hier jedoch keine Empfehlung gegeben werden. Vor Therapiebeginn mit immunsuppressiven Medikamenten sollte ein Infektionsscreening auf Hepatitis B, Tbc und EBV erfolgen sowie der Impfstatus überprüft werden [94].

1.1.5.2 Therapeutische Ansätze außerhalb der Leitlinientherapie

Komplementäre Therapien können gemäß Leitlinie nach Absprache mit den behandelnden Ärzten zur Ergänzung der Standardtherapie angewendet werden. Dabei soll die Beurteilung der komplementärmedizinischen Verfahren nach Kriterien einer evidenzbasierten Medizin erfolgen. Zu neuen Therapieansätzen, deren Rolle jedoch noch etabliert werden muss, gehören u. a. Therapien mit Antibiotika, Helminthen, Heparin, Leukozytenapherese und Probiotika [80]. Nach der deutschen Leitlinie kann z. B. Curcumin oder *Plantago ovata* in der remissionserhaltenden Behandlung eingesetzt werden. Auch eine Mind-Body-Therapie und Akupunktur werden empfohlen. Es gibt eine Evidenz für den therapeutischen Benefit von Probiotika zur Remissionsinduktion, wenn sie zur Standardtherapie additiv eingenommen werden [10]. Die Appendektomie als therapeutische Intervention ist in der Literatur umstritten. Während einige Studien einen gemilderten klinischen Verlauf bei appendektierten Patienten zeigten [126], wiesen andere Studien keinen Effekt einer Appendektomie auf den Verlauf der Colitis ulcerosa nach [127]. Die Wirksamkeit des Stuhltransfers (auch fäkale Mikrobiom Transplantation - FMT) wurde in mehreren kontrollierten Studien untersucht, die jedoch unterschiedliche Ergebnisse ergaben. Eine kanadische Studie konnte in der aktiven Gruppe eine 24% Remissionsrate gegenüber 5% Remissionsrate in der Plazebogruppe zeigen, während eine niederländische Studie keinen signifikanten Nutzen gegenüber der Kontrollgruppe (Behandlung mit autologem Stuhl) nachweisen konnte. Vermutlich spielen Faktoren wie Darreichungsform und Häufigkeit des Transfers eine Rolle. In der kanadischen Studie konnten vor allem Patienten profitieren, bei denen die Erkrankung erst kürzlich diagnostiziert wurde oder die begleitend ein Immunsuppressivum einnahmen [128].

Eine Übersichtsarbeit aus dem Jahre 2017 über Studien mit insgesamt 277 Patienten zeigte, dass die FMT bezüglich klinischen und endskopischen Emissionsraten der Therapie mit einem Placebo überlegen ist [129].

1.1.6 Verlauf und Prognose

Der Verlauf der Erkrankung kann sehr variieren und ist schwer vorherzusehen. Prinzipiell unterscheidet man drei Verlaufsformen: 85 % der Patienten weisen einen chronischen-rezidivierenden Verlauf auf, bei welchem sich Perioden der Remission von akuten Krankheitsschüben unterscheiden. Die akuten Phasen können durch körperliche oder psychische Belastungsreaktionen hervorgerufen werden. Die Erkrankung beschränkt sich meist auf Rektum, Sigma und distales Kolon. Zehn Prozent der Patienten leiden an der chronisch-kontinuierlichen Form. Nur fünf Prozent der Patienten zeigen einen akuten, fulminanten Verlauf. Dieser ist durch einen plötzlichen Krankheitsbeginn mit Tenesmen, Durchfällen, hoher Körpertemperatur und Schock gekennzeichnet [75]. Eine schwere Form der Colitis ulcerosa gilt bis heute als lebensbedrohliche Erkrankung. Es sollte eine sofortige intensive Therapie in spezialisierten Zentren erfolgen. 20 – 30 % aller Patienten wurden nach zehn Jahren kolktomiert, davon bis zu 40% der Patienten mit einer schweren Form der Erkrankung [130, 131]. Bei ungefähr 50% Patienten war aufgrund des Verlaufes der Erkrankung eine immunsuppressive Therapie mit Steroiden, Thiopurinen oder anti-TNF- α -Antikörpern notwendig [132].

Diese immunsuppressive Therapie erhöhte das Risiko für opportunistische Infektionen signifikant [133]. Zum Diagnosezeitpunkt leiden 30-50% der Patienten an einer distalen Kolitis, 20-30% an einer Linksseitenkolitis und 20% an einer Pankolitis [12]. Wenn die Diagnose vor dem 40. Lebensjahr gestellt wird, sind eher Frauen betroffen und die Krankheit verläuft progredienter mit häufigeren Hospitalisierungen [134]. Die Sterberate ist bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zur normalen Population signifikant erhöht. Die durchschnittliche Lebenserwartung ist in den letzten Jahren jedoch stark gestiegen [135]. Lebenslimitierende Faktoren sind Komplikationen und Neoplasien. Lebensgefährliche Akutereignisse umfassen massive Blutungen, das toxische Megakolon mit septischem Verlauf, Peritonitis und Darmperforationen [75].

Durch intravenöse Gabe von Kortikosteroiden, rechtzeitige Kolektomie und den Einsatz neuer Immunsuppressiva konnte die Mortalität in spezialisierten Zentren von ca. 30% auf 1% gesenkt werden [136]. Notfälle und letale Verläufe gibt es heutzutage nur noch selten [137]. Patienten mit Colitis ulcerosa haben ein erhöhtes Risiko, an kolorektalen Karzinomen zu erkranken. Nach zehn Jahren sind 2%, nach 20 Jahren 8% und nach 30 Jahren 18% der Patienten erkrankt [26]. Das Risiko, kolorektale Karzinome zu entwickeln, steigt mit der Dauer und dem Ausmaß der Erkrankung [138].

1.2 Therapeutische Apherese

Das Wort Apherese stammt aus dem Griechischen und bedeutet „entfernen, wegnehmen“. Es wird umgangssprachlich auch Blutwäsche oder Blutreinigungsverfahren genannt und bezeichnet ein Therapieverfahren, bei dem das venöse Blut extrakorporal von bestimmten Substanzen gereinigt wird. Als therapeutische Apherese wird die Entfernung von pathogenen plasmatischen (Plasmapherese) und/oder zellulären Blutbestandteilen (Zytapherese) mittels extrakorporaler Techniken mit einem direkten therapeutischen Ziel bezeichnet. Im weiteren Sinne beinhaltet diese Definition auch Techniken wie die Hämodialyse oder Hämodiafiltration bei chronischer Niereninsuffizienz. Die verschiedenen Aphereseformen können nach klinischer Indikation, Technologie und Selektivität unterschieden werden. Die der Apheresetechnik zugrunde liegenden physikochemischen Prozesse sind Adsorption, Filtration, Präzipitation und Zentrifugation. Hierbei können Vollblut- und Plasmaverfahren (Plasmapherese) unterschieden werden. Bei der Zytapherese werden die Zielzellen durch Zentrifugation und/oder Adsorption, z. T. kombiniert mit Filtration, direkt aus dem Vollblut entfernt. Bei der Plasmapherese dagegen wird das Plasma zunächst durch Zentrifugation oder Filtration separiert. Dann erfolgt die Adsorption oder Präzipitation der Zielmoleküle. Indikationen der therapeutischen Apherese sind vor allem Autoimmun- und Stoffwechselerkrankungen sowie die Antikörperelimination in der Transplantation. Allgemein gewährleistet die therapeutische Apherese ein hohes Maß an Sicherheit und kann daher sowohl bei Schwangeren [139] als auch bei Kindern [140] eingesetzt werden. Zur Bewertung der therapeutischen Apherese gibt es derzeit einen Mangel an randomisierten, kontrollierten klinischen Studien, sodass nur schwer von einer „Evidenz-basierten-Medizin“ gesprochen werden kann. Für die Zukunft bedarf es weiterer randomisierter, kontrollierter Studien mit klar definierten Endpunkten und kritischer Patientenselektion [27].

1.2.1 Einsatzgebiete

Die therapeutische Apherese hat hauptsächlich fünf Einsatzbereiche:

1. Low Density Lipoprotein-Cholesterin (LDL)/Lipoprotein(a)-Apherese: Entfernung des LDL-Cholesterins und/oder Lipoprotein(a) aus dem Blut von Patienten mit medikamentenrefraktärer Hypercholesterinämie.
2. Immunapherese: Entfernung von Antikörpern bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen oder nach Transplantation.
3. Hämorheopherese: Entfernung von rheologisch-relevanten Substanzen wie Fibrinogen, LDL-Cholesterin oder anderen Makromolekülen bei Patienten mit Hyperviskositätssyndromen, altersbedingter Makuladegeneration, akutem Hörsturz oder anderen mikrovaskulären Störungen.

4. Zytapherese: Entfernung von Zellen des Immunsystems (Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten, Lymphozyten) bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.
5. Toxinapherese: Eliminierung von Toxinen bei Patienten mit endogenen oder exogenen Vergiftungen (Leberversagen, Septischer Schock, Pilz- und Arzneimittelvergiftung).

Die therapeutische Apherese wurde schon bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern eingesetzt. Hierzu zählen u. a. der systemische Lupus erythematoses, die idiopathische thrombozytopenische Purpura, Multiple Sklerose, Guillain-Barré Syndrom, Myasthenia gravis, Pemphigus vulgaris, Pemphigoid, Nierenerkrankungen wie die fokale glomeruläre Sklerose, das hämolytisch urämische Syndrom oder Hämophilien.

1.2.2 Adsorptive Zytaphereseverfahren

Chronisch inflammatorische Erkrankungen wie die Colitis ulcerosa sind mit einer verstärkten Produktion von zirkulierenden oder mukosaständigen immunologisch aktiven Zellen wie Makrophagen, Dendritischen Zellen, Neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten und Plasmazellen assoziiert. Während der Entzündung werden Granulozyten und Thrombozyten zuerst aktiviert. Sie wandern zum Ort der Entzündung, infiltrieren die Mukosa und initiieren dort zusammen mit Leukozyten den weiteren Entzündungsprozess. Aufgrund der schon besprochenen vielfältigen Rolle von Thrombozyten bei der Inflammation und Koagulation sollten diese im akuten Schub effektiv behandelt werden [141]. Die adsorptive Zytapherese entfernt je nach Verfahren selektiv verschiedene Leukozytenpopulationen und Thrombozyten aus dem Blut. Zusätzlich wirken Aphereseverfahren durch Immunregulation nicht-adsorbiert Zellen [142]. Das Verfahren gewährleistet ein hohes Maß an Sicherheit, auch dadurch, dass keine weiteren Substanzen benötigt werden, die Nebenwirkungen oder andere unerwünschte Ereignisse verursachen könnten. Nebenwirkungen treten meist nur in geringem Maße in Form von Übelkeit, Kopfschmerzen, Fieber oder Müdigkeit auf [143]. Zum aktuellen Zeitpunkt sind vier kommerziell erhältliche Zytapheresesysteme auf dem Markt.

1.2.2.1 Cellsorba®

Das Verfahren Cellsorba® wird von der Firma ASAHI-Kasei aus Japan hergestellt und vertrieben. Der Adsorber besteht aus mit Polyethylenterephthalat-Fasern gefüllten, zylindrischen Modulen und adsorbiert Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Thrombozyten [144, 145]. Die Module haben ein Volumen von 170 ml, eine Länge von 200 mm und einen Durchmesser von 50 mm [146].

Das Verfahren wird zur Leukozytenapherese (LCAP) gezählt. Unter Antikoagulation mit Heparin wird Blut aus der Kubitalvene entnommen, mit Hilfe einer Blutpumpe zum Adsorber geleitet und über eine zweite Punktionsnadel antekubital zurückgegeben.

Der Adsorber besteht aus einem äußeren Prä-Filter aus Fasern mit 10–40 µm Durchmesser und einem inneren Hauptfilter aus Fasern mit 2,6 µm Durchmesser. Die Apherese mit Cellsorba® wird standardmäßig einmal wöchentlich über fünf Wochen durchgeführt. Jede Behandlung dauert 60 min. Bei einem Blutfluss von 30-50 ml/min werden ca. 2-3l Blut gereinigt [147]. Eine intensivierte Therapie mit mehr als vier Therapiesitzungen innerhalb der ersten zwei Wochen kann dazu beitragen, dass die klinische Remission häufiger und schneller erreicht wird [148]. Es werden 90-100% der Granulozyten und Monozyten, 30-60% der Lymphozyten und ca. 30% der Thrombozyten herausgefiltert. Nach der Therapie steigt die Anzahl der Leukozyten kurzzeitig auf bis zu 170% des Ausgangswertes (20 min nach Apheresebeginn). Diesen „Overshoot Effekt“ verursachen naive Leukozyten, die aus dem Knochenmark nachproduziert werden.

Auch proinflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-2, IL-8 und IFN-γ werden reduziert. Sechs Studien mit insgesamt 128 Colitis ulcerosa-Patienten und Cellsorba®-Behandlung zeigten eine durchschnittliche Response-Rate von 74% [147]. Eine prospektive, unkontrollierte Studie mit 847 Patienten mit Colitis ulcerosa aus dem Jahre 2014 bestätigte die guten Ergebnisse: 68,9% der Patienten zeigten eine Remission, die mukosale Heilungsrate betrug 62,5% [148]. Eine randomisierte, Scheinapherese-kontrollierte Doppelblind-Studie mit zehn Patienten in der aktiven und neun Patienten in der Sham-Gruppe wies eine signifikante Verbesserung der CAI-Werte in der aktiven gegenüber der Sham-Gruppe (80% vs. 33%) nach [149].

1.2.2.2 Adacolumn®

Das Apheresesystem Adacolumn® wurde von der Firma JIMRO/OTSUKA aus Japan entwickelt und wird über die Firma OTSUKA Pharmaceutical Europe Ltd. vertrieben. Dieses Zytapherese-System besteht aus einer Säule, die ca. 35.000 Zellulose-Azetat-Kugeln mit einem Durchmesser von 2 mm enthält und 220 g schwer ist. Die Säule hat eine Länge von 206 mm und einen Innendurchmesser von 60 mm. Das Verfahren wird zur Granulozyten/Monozyten Apherese (GMCAP) gezählt [150]. Auch für das Adacolumn®-System muss eine Antikoagulation des Blutes mit Heparin erfolgen.

Die Standardtherapie beinhaltet fünf Behandlungseinheiten mit je 60 min über fünf Wochen mit einer Frequenz von einer Behandlung pro Woche. Pro Sitzung werden etwa 1800 ml Vollblut behandelt, der Blutfluss beträgt 30 ml/min [151].. Der Wirkmechanismus beruht vermutlich sowohl auf der Adsorption von Granulozyten und Monozyten als auch auf einer Modulation des Immunsystems [152]. Nach der Adsorption von Granulozyten,

Monozyten/Makrophagen werden auch deren proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL1 β b, IL-6 und IL-8 signifikant reduziert [142]. Darüber hinaus wird die L-Selektin-Expression herunterreguliert und die Mac-1-Expression auf Granulozyten hochreguliert, was die Adhäsionskapazitäten für Leukozyten auf endothelialen Zellen reduziert und die Leukozytenmigration zum entzündeten Gewebe verhindert. Außerdem fördert eine gesteigerte Mac-1-Expression die Apoptose von Granulozyten. Kurz nach Apheresebeginn wird ein Einstrom von CD10-negativen unreifen Neutrophilen aus dem Knochenmark beobachtet, welche ein geringeres proinflammatorisches Potenzial aufweisen als reife Neutrophile [147, 152]. Dendritische Zellen [153] und proinflammatorische CD14 $^+$ CD16 $^+$ Monozyten [154] sind in ihrer Konzentration nach Apherese verringert, während die Anzahl regulatorischer T-Zellen (CD4 $^+$ CD25 $^{+high}$ Foxp3 $^+$) ansteigt [155]. Mehrere, meist unkontrollierte Studien konnten belegen, dass Patienten mit Colitis ulcerosa von einer Adacolumn $^{\text{®}}$ -Behandlung profitieren. Die Response-Raten variierten hierbei zwischen 40% und 100%. Danese et al. zeigten, dass in insgesamt 22 Studien mit 588 Patienten durchschnittliche Remissionswerte von 74,5% erreicht wurden [147]. Zur Bewertung dieser Ergebnisse muss jedoch einschränkend beachtet werden, dass sich die einzelnen Studien in Bezug auf Krankheitsstadien und Therapiefrequenz unterschieden. Einige kontrollierte Studien zeigten, dass eine Therapie mit Adacolumn $^{\text{®}}$ einen Zusatznutzen im Vergleich zur Steroidbehandlung hatte [156, 154, 157]. Besonders steroid-naive Patienten, Patienten kurz nach Diagnose der Colitis ulcerosa oder nach Beginn eines Schubes mit einer aktiven Erkrankung profitieren von der Apherese [158]. In einer randomisierten, doppelblinden und sham-kontrollierten Studie von Sands et al. konnte hingegen keine Wirkung der Apherese dargestellt werden [159].

1.2.2.3 Immuloc $^{\text{®}}$

Das Verfahren Immuloc (ehemals Granuwash) der Firma Membrana GmbH/3M Deutschland GmbH wurde in einer Pilotstudie in den Jahren 2007 bis 2009 erstmals an zehn Patienten mit mäßiger bis schwerer chronisch aktiver Colitis ulcerosa angewandt. Das Adsorbermodul besteht aus 1 mm dicken, zellulosehaltigen Filamenten und adsorbiert hauptsächlich Monozyten/Makrophagen und Granulozyten. Das Gesamtvolumen des Adsorbermoduls beträgt 350 ml, die Adsorptionsoberfläche 1,1 mm 2 und das darin enthaltene Volumen 62 ml. Die Standardbehandlung umfasst fünf Therapien über fünf Wochen mit einer Dauer von 60 min bei einem Blutfluss von 30 ml/min unter Heparin-Antikoagulation. Die Apherese mit dem Immuloc-Verfahren kann ebenfalls zur GMCAP gezählt werden. In einer Pilotstudie mit 17 Patienten wurde, basierend auf dem CAI-Wert, nach sechs Wochen eine Remissionsrate von 70,6%, nach zehn Wochen eine Remissionsrate von 53% erreicht [160]. Die Behandlung erfolgte

einmal pro Woche für 60 min über fünf Wochen. Eine Arbeit von Schultheiß und Mitarbeitern aus dem Jahr 2015 zeigte eine Remissionsrate von 40% und ein klinisches Ansprechen von 70% der Patienten nach insgesamt 10 Behandlungen mit zwei Behandlungen pro Woche für jeweils 2 Stunden [161].

1.2.2.4 Immunopure®

Das Verfahren Immunopure® der Firma Nikkiso Co., Ltd. (Kanzawa, Japan) adsorbiert Monozyten, Granulozyten und in stärkerem Maße im Vergleich zu den anderen Zytapherese-Adsorbern Thrombozyten. Es besteht aus dem Adsorber, dem Schlauchsystem (ABT-002PX, Nikkiso Co., Ltd, Japan) und dem Blutmonitor (LPM-01, Nikkiso Co., Ltd, Japan). Die Adsorbermodule sind mit gammasterilisierten Polyarylat-Resin-Kugeln (PAR-Kugeln) mit einem Durchmesser von 1 mm gefüllt.

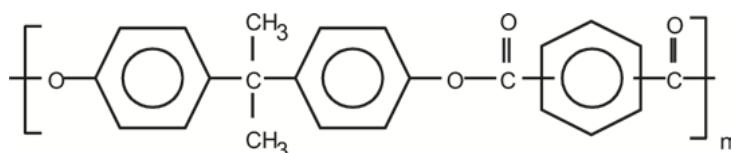


Abb. 2: Molekulare Struktur von Polyarylat-Resin [162]

Die Immunopure® -Module haben eine Höhe von 185 mm und einen Durchmesser von 59 mm bei einem Gewicht von 537 g. Das Endvolumen beträgt 350 ml mit einem Totvolumen von 139 ml. Zur Antikoagulation wird Standard-Heparin verwendet [1].

Immunopure® wurde 2011 CE-zertifiziert. 2013 wurde Immunopure in einer ersten Pilotstudie an 10 Patienten angewandt. Hier gingen 80% (acht von zehn) der Patienten nach der Therapie in Woche 10 in Remission [1]. 2019 wurde die erste prospektive, randomisiert und kontrollierte Studie über Immunopure® veröffentlicht. In dieser wurden insgesamt 24 Patienten mit therapierefraktärer Colitis ulcerosa entweder mittels Apherese oder Steroiden behandelt. Nach 12 Wochen gingen in der Apheresegruppe 25% in Remission – 75% sprachen auf die Therapie an – in der Steroidvergleichsgruppe betrug die Remissionsrate 20%, das Ansprechen 50% [163].

1.2.2.5 Übersicht - Vergleich der Apherese-Verfahren

Tab. 4: Vergleich der erhältlichen Apheresesysteme nach Danese [147]^{*1}, Tiburtius [164]^{*2} und Ramlow [1]^{*3}

Verfahren	Cellsorba ^{® *1}	Adacolumn ^{® *1}	Immuloc ^{® *2}	Immunopure ^{® *3}
Firma	Asahi Medical	Japan Immunoreserach Laboratories Co	Membrane / 3M	Nikkiso Europe
Erste Verwendung	2002	2003	2007	2012
Material	Polyesterfasern	Zellulose Acetat Perlen	Zellulosehaltige Filamente	Polyarylat-Resin-Kugeln
Wirkung auf Granulozyten	90% eliminiert	65% eliminiert	Eosinophile: 10% eliminiert Basophile: 17% eliminiert	47% (neutrophile)
Wirkung auf Monozyten	90% eliminiert	55% eliminiert	15% eliminiert	66% eliminiert
Wirkung auf Lymphozyten	70% eliminiert	keine Wirkung (2 %)	Keine Wirkung	< 10% eliminiert
Wirkung auf Thrombozyten	30 % eliminiert	geringe Wirkung	8% eliminiert	80% eliminiert
Wirkung auf Erythrozyten	< 10%	keine Wirkung	keine Wirkung	keine Wirkung
Behandlungs-dauer	60min / Woche, 5 Wochen	60min / Woche; 5 Wochen	60 Min / Woche 5-10 Wochen	60min/ Woche, 5 Wochen
	Fulminante UC: 3/Woche; 2 Wochen			
Durchflussrate	30-50 ml/h	30ml/h	30ml / h	30 ml/h
Remissionsraten	50% - 80% (61,6%)	40% - 100% (74,5%)	40 - 63% (51,5%)	67 % - 80% (73,5%)

1.2.3 Aktueller Status der Zytapherese

In Japan wurden die Verfahren Adacolumn[®] und Cellsorba[®] bereits in den Jahren 2000 und 2001 zur Behandlung der Colitis ulcerosa zugelassen. Seit den prospektiven,

randomisierten Multi-Center Studien von Shimoyama [156] und Sawada [165] sind die Verfahren dort fester Teil der Therapie. Im Gegensatz zu Japan empfehlen die aktuellen europäischen und amerikanischen Leitlinien jedoch weder den Einsatz der LCAP noch der GMCAP in der klinischen Praxis, obwohl alle beschriebenen Systeme untersucht, CE-zertifiziert und für die Behandlung der Colitis ulcerosa zugelassen wurden.

Tab 5. Studien bzgl. der Effektivität von Adacolumn in der Behandlung von erwachsenen / pädiatrischen Patienten bei der Colitis ulcerosa. („generelles Ansprechen“ beinhaltet Ansprechen auf Therapie und Remission) – nach Danese [147]

Autor / Gruppe	Jahr	Indikation	Patienten in finaler Analyse	Generelles Ansprechen
Shimoyama 2001 [156]	2001	Moderate- bis schwere CU, therapierefraktär zu herkömmlicher Therapie	53	58% (31/53)
Hanai 2003 [166]	2003	Steroidrefraktäre CU Steroid-naive CU	31 8	87% (27/31) 100% (8/8)
Suzuki 2004 [167]	2004	Steroid-naive CU	20	85% (17/20)
Naganuma 2004 [168]	2004	Steroid-refraktäre - oder abhängige CU	44	75% (33/44)
Hanai 2004 [169]	2004	Steroid-abhängige CU	46	94% (43/46)
Yamamoto 2004 [170]	2004	Aktive distale CU	30	87% (26/30)
Domènech 2004 [171]	2004	Steroid-abhängige CU	13	76% (10/13)
Kanke 2004 [172]	2004	aktiv-steroid-naive / refraktäre / abhängige CU	60	83% (50/60)
Kim 2005 [173]	2005	Moderate- bis schwere CU, therapierefraktär zu herkömmlicher Therapie	27	70% (19/27)
Kruis 2005 [174]	2005	Steroid-abhängige CU	35	43% (15/35)
D'Ovidio 2006 [175]	2006	Steroid-refraktäre - oder abhängige CU	12	100% (12/12)
Giampaolo 2006 [176]	2006	Steroidrefraktäre CU	8	100% (8/8)
Sands 2006 [159]	2006	therapierefraktär zu herkömmlicher Therapie	15	40% (6/15)

Sakuraba A 2006 [177]	2005	moderat aktive CU	45 (wöchentliche Therapie) 52 (halbwöchentliche Therapie)	47% (12/45) 73% (38/52)
Tanaka T. et al 2006 [178]	2006	Steroid-naive - oder abhängige CU	12 17	58% (7/12) 100% (17/17)
Hanai 2008 [154]	2006	Schwere CU	33 (halbwochentlich)	54 %
Sakuraba A 2006 [179]	2006	Aktive Pouchitis	6	67% (4/6)
Tomomasa 2003 [180]	2003	Steroidrefraktäre CU bei Kindern	12	67% (8/12)
Ikeda H 2006 [181]	2006	Steroidrefraktäre CU bei Kindern	4	75% (3/4)

Bei Anwendung der Apherese mit Adacolumn konnte bei den o.g. Studien bei insgesamt 583 Patienten eine durchschnittliches „generelles Ansprechen“ von 75% erzielt werden. Die Summierung „generelles Ansprechen“ beinhaltet dabei Patienten die auf die Therapie angesprochen haben und diejenigen, die in Remission gegangen sind.

Tab 6. Studien bzgl. der Effektivität von Cellsorba in der Behandlung von erwachsenen / pädiatrischen Patienten bei der Colitis ulcerosa / M. Crohn. („generelles Ansprechen“ beinhaltet Ansprechen auf Therapie und Remission) – nach Danese [147]

Autor / Gruppe	Jahr	Indikation	Patienten in finaler Analyse	Generelles Ansprechen
Sawada 1995 [182]	1995	Aktive CED	8 CU 5 CD	75% (6/8) 100% (5/5)
{Sawada 1997 [183]	1997	aktive mild-schwere CU	45	77,8% (35/45)
Sawada 2003 [184]	2003	Aktive CU	39	74% (29/39)
Sawada 2005 [149]	2005	fulminant schwere CU mit tox. Megakolon	6	66,6% (4/6)
Sawada 2005 [199]	2005	moderat bis schwere CU, therapierefraktär zu Steroiden	10 (Aktive Apherese) 9(Scheinapherese)	80% (8/10) 33,3 (3/9)
Emmrich 2007 [185]	2007	therapierefraktäre CU zu herkömmlicher Therapie	20	70% (14/20)
Kosaka T. et al 1999 [186]	1999	therapierefraktäre CD zu herkömmlicher Therapie	18	50% (9/18)

Die o.g. Studien konnten bei insgesamt 160 Patienten ein durchschnittlichen „generelles Ansprechen“ von 70% darstellen. Eine Cochrane Analyse von Yoshino et al. [187] kam zu dem Ergebnis, dass die Granulozyten- und Monozytenapherese Steroiden bzgl. der Remissionsinduktion überlegen ist. Vor allem bei Patienten, bei denen Steroide nicht wirken, aufgrund des Nebenwirkungsprofiles nur unter Vorsicht oder sogar kontraindiziert sind, wie bei Schwangeren und kleinen Kindern, sollte die Apheresetherapie in Betracht gezogen werden und ist hier eine wirksame Alternative [140]. Bedauerlicherweise fehlen bisher größere Studien, in welchen die Apherese bei Risikopatienten untersucht wurde. Vor allem Glukokortikoid-naive Patienten sprechen gut auf die Apheresetherapie an, sodass ein frühzeitiger Einsatz empfohlen werden sollte [188]. Suzuki und Kollegen empfehlen die Apherese sogar als Erstlinientherapie bei steroidnaiven Patienten [167]. Erste Studien konnten bereits darstellen, dass die Apherese sogar bei Patienten wirksam ist, die auch auf eine Therapie mit neuen Biologicals nicht ansprachen [189, 190]}. Beim Vergleich einzelner Studien ist auffällig, dass in Japan tendenziell höhere Remissionsraten erreicht werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass hier die Apherese früher zum Einsatz kommt. Der frühere und im Vergleich zu Europa deutlich intensivere Therapieansatz in Japan ist u.a darauf zurückzuführen, dass sich die Standards für Zulassungsstudien in Japan von den Regularien in Europa unterscheiden. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die bisher überwiegend positiven Erfahrungen im Rahmen kleinerer Studien gewonnen wurden, in denen doppelblind bzw. randomisiert erhobene Vergleichsdaten fehlen. Sawada et al. führten eine erste doppelblinde, randomisierte Studie mit 19 Patienten und der Apherese mit Cellsorba® durch. Zehn Patienten erhielten eine Apherese und neun Patienten eine Scheinapherese. Nach Erhebung des klinischen Aktivitätsindex wurden in der Apheresegruppe Remissionsraten von 80% gegenüber 33% in der Scheingruppe erzielt [149]. Um die bisherigen positiven Erfahrungen in der Apheresetherapie auf höchstem Evidenzlevel zu bestätigen, planten Sands und Mitarbeiter eine doppelblinde, randomisierte Studie mit 168 Patienten an 36 Studienzentren in Nordamerika sowie 58 Patienten in Europa und Japan. Die Ergebnisse wurden im Jahr 2008 veröffentlicht und stellten die positiven Ergebnisse vorheriger Studien an über 20000 Patienten erstmals in Frage, da kein signifikant positiver klinischer Effekt der Zytapherese im Vergleich zur Scheinapherese dargestellt werden konnte [159]. Die genaue Positionierung der adsorptiven Zytapherese in der Therapie der aktiven chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist aufgrund dieser unterschiedlichen Studienergebnisse gegenwärtig umstritten. Europäische Studien konzentrieren sich vermehrt auf schwer zu behandelnde Patienten [190]. Ob diese zukünftig Eingang in Leitlinien finden wird, hängt neben der wissenschaftlichen Seite auch von kulturellen und finanziellen Faktoren ab. Wirtschaftlichkeit medizinischer Verfahren hat in der modernen Medizin eine enorme Bedeutung. Auch der Hersteller Nikkiso begründet die fehlende

Anwendung und Verbreitung des Verfahrens mit dem Kostenfaktor [191]. Das Verfahren ist zwar CE-zertifiziert, dies bedeutet jedoch nicht, dass die Therapiekosten automatisch von den deutschen Krankenkassen erstattet werden. Andere europäische Länder wie Spanien, Italien, Finnland und Norwegen erstatten unter bestimmten Bedingungen (z. B. zur Remissionsinduktion bei Thiopurin-Intoleranz bei Steroid-abhängigen Patienten, bei Steroid-Kontraindikation sowie in begründeten Einzelfällen) bereits die Apheresetherapie [192]. Panés et al. schätzen die Therapiekosten für Colitis ulcerosa-Patienten mit 6740€ für die medikamentöse Therapie und 6959€ für die Apherese (bei einer Therapie mit Adacolumn®) pro Jahr. Sobald Patienten jedoch steroidabhängig werden, steigen die Therapiekosten enorm. Die Autoren kamen zu dem Entschluss, dass die Apherese ein kosteneffektives Verfahren ist und auch bei steroidabhängigen Patienten aufgrund des Sicherheitsprofiles die Extrakosten rechtfertigt [193]. In der Therapie mit Aminosalicylaten sind Nebenwirkungen wie fibrotische Lungenveränderungen, Veränderungen des Blutbildes bis hin zur Agranulozytose beschrieben [194]. Bekannte Nebenwirkungen von Steroiden sind u.a. die prodiabetogene Wirkung, Osteoporose oder gastrointestinale Ulzera. Neben der Reduzierung dieser Nebenwirkungen sind auch direkte und indirekte finanzielle Folgen durch zusätzliche Therapiekosten und Arbeitsausfälle zu beachten. Während bei dieser Anwendungsbeobachtung keine unerwünschten Ereignisse oder Nebenwirkungen auftraten, lassen Studien mit größeren Fallzahlen auf ein prinzipiell mildes Nebenwirkungsmuster schließen. Hier ist vor allem eine große Multizenterstudie von Hibi et al. zu nennen, bei der die Verträglichkeit der Apherese mittels Adacolumn® an 697 Probanden untersucht wurde [195]. Neben milderer Symptome wie Übelkeit und Kopfschmerzen werden orthostatische und vasovagale Synkopen beschrieben. Solche eher leichten Nebenwirkungen wurden in verschiedenen Studien bei ca. 8% der Patienten, ernsthafte Komplikationen teilweise gar nicht dokumentiert. Dieses Nebenwirkungsprofil ist dabei typisch für extrakorporale Therapiemethoden und nicht spezifisch für die Apherese [196, 197, 198]. Nichtsdestotrotz sollte der Einsatz der Apherese nicht unreflektiert erfolgen.

II Ziele und Fragestellungen dieser Dissertation

Das Ziel dieser Dissertation war die Evaluierung des Immunopure® -Zytapherese-Verfahrens *in vitro* mit Hilfe eines Zirkulationsmodells unter Einsatz von Blut gesunder Spender und *in vivo* an Patienten mit moderater bis schwerer Colitis ulcerosa (CAI nach Rachmilewitz 6-10), welche durch eine Standardmedikation keine Remission erzielen konnten oder die eine Intoleranz gegenüber Steroiden und/oder Immunsuppressiva aufwiesen. Folgende Fragestellungen standen im Mittelpunkt der Untersuchungen:

- Welche prozentualen Veränderungen in der Anzahl von Thrombozyten, Thrombozyten-Aggregaten und Thrombozyten-Mikropartikeln sind während einer Immunopure® -Zytapherese *in vitro* (im Vergleich zu Sham-Minimodulen) und *in vivo* (im Vergleich zum Ausgangswert) zu beobachten?
- Welche Wirkungen sind auf den Hämoglobinwert sowie auf die Zellpopulationen von Erythrozyten, Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und basophilen Granulozyten zu erheben? Wie verändern sich die Zellpopulationen über einen Zeitraum von fünf Wochen?
- Wie verändern sich die Thrombozytenaktivierungsmarker CD42b/CD63 und CD42b/CD62P während einer Immunopure® -Zytapherese *in vitro* (im Vergleich zu Sham-Minimodulen) und *in vivo* (im Vergleich zum Ausgangswert)?
- Welche prozentualen Veränderungen treten bei anderen Zellpopulationen (CD14+, CD10+, CD62L+, Mean CD62L+, CD11b+, Mean CD11b+, CD62L+CD11b+, CD14+CD16+, CD42b+CD14+, CD42b+CD3+, CD42b+CD62P+, CD42b+CD63+, CD42b+CD11b+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+TCRgd+, CD3+HLADR+) während einer Immunopure® -Zytapherese *in vitro* (im Vergleich zu Sham-Minimodulen) und *in vivo* (im Vergleich zum Ausgangswert) auf?
- Wie verändern sich die Konzentrationen an sP-Selektin und sCD40L *in vitro* (im Vergleich zu Sham-Minimodulen) und *in vivo* (im Vergleich zum Ausgangswert) vor und nach Immunopure® -Zytapherese?
- Wie effektiv ist die Therapie und wie lange hält der Therapieerfolg an?
- Wie sicher ist das Verfahren und wie sehen mögliche Nebenwirkungen aus?
- Wie können Aphereseverfahren noch weiter entwickelt werden?
- Wann können Aphereseverfahren am wirksamsten eingesetzt werden?

Mittels eines Fragebogens wurde nach Abschluss der Anwendungsbeobachtung Kontakt mit den Probanden aufgenommen. So wurden die Patienten bzgl. Lebensqualität vor und nach der Therapie, subjektiver Wirkung der Therapie und allgemeinen Erfahrungen befragt.

III Material und Methoden

3.1 Anwendungsbeobachtung zur Wirkung der Zytapherese *in vivo* an sechs

Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa

3.1.1 Einschlusskriterien

Patienten über 18 Jahren wurden in die Anwendungsbeobachtung aufgenommen. Voraussetzung war, dass die Patienten psychisch und physisch für die Therapie geeignet waren, die Anforderungen und möglichen Komplikationen dieser Behandlung verstanden hatten und schriftlich einwilligten. Die Diagnose Colitis ulcerosa sollte klinisch und endoskopisch mindestens sechs Monate zuvor gestellt worden sein. Ein aktiver Schub der Erkrankung mit einem CAI zwischen sechs und zehn Punkten, geeignete Gefäßzugänge, ein systolischer Blutdruck von > 100 mmHg, ein stabiler Hämatokrit (>35 %) und eine stabile Gerinnung waren weitere Voraussetzungen für die Teilnahme an dieser Anwendungsbeobachtung.

3.1.2 Ausschlusskriterien

Von der Anwendungsbeobachtung ausgeschlossen wurden Patienten, die an einer interventionellen klinischen Studie teilnahmen, schwanger waren oder stillten. Eine aktive Infektion oder ein Zustand nach einer Organtransplantation waren ebenfalls Ausschlusskriterien. Ebenso wurden Patienten mit Nachweis von Hepatitis B Oberflächenantigenen (HBsAG), Hepatitis C Antikörpern (anti-HCV) und/oder Hepatitis C RNA (HCV-RNA), mit früherer Hepatitisinfektion sowie einer Allergie oder Intoleranz gegenüber den verwendeten Materialien oder Heparin nicht berücksichtigt. Kardiovaskuläre Risikopatienten, die an hämodynamisch relevanten Arrhythmien oder einer instabilen Angina pectoris litten oder die einen Myokardinfarkt in den letzten drei Monaten, eine Bypass-Operation, schwere Gefäßerkrankungen, einen unkontrollierbaren Bluthochdruck (systolisch > 180 mmHg; diastolisch > 115 mmHg), eine bekannte Störung der Blutgerinnung oder eine nicht kontrollierte Erkrankung des Herzens, der Leber, der Nieren oder des zentralen Nervensystems in der Anamnese hatten, wurden ebenfalls aus der Anwendungsbeobachtung ausgeschlossen.

3.1.3 Vorstellung der Patienten

In die Anwendungsbeobachtung wurde eine Gruppe von insgesamt sechs Patienten mit moderater bis schwerer aktiver Colitis ulcerosa (CAI \geq 6-13) aufgenommen (siehe Tab. 7). Je drei Probanden waren männlich und drei weiblich. Die Probanden waren zwischen 27 und 52 Jahre alt (Durchschnittsalter: 40,5 Jahre) und haben auf eine Standardtherapie mit Steroiden und/oder Immunsuppressiva nicht ausreichend angesprochen oder wiesen für diese eine Kontraindikation oder Intoleranz auf. Alle Patienten wurden über die möglichen

Risiken der Behandlung aufgeklärt und haben eine Einverständniserklärung unterschrieben. Die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock bewertete die geplante Studiendurchführung positiv.

Tab. 7: Patientencharakteristika.

Patient	Geschlecht	Alter	Jahre nach Diagnose	Medikamentöse Therapie	CAI vor Therapie	Diagnose (E2 oder E3)
1	Männlich	52	9	5-ASA, Glukokortikoide, Tacrolimus	6	Pankolitis (E3)
2	Weiblich	27	16	Tacrolimus, 5-ASA	13	Pankolitis (E3)
3	Männlich	30	4	5-ASA, Glukokortikoide	7	Linkskolitis (E2)
4	Weiblich	35	11	5-ASA	13	Pankolitis (E3)
5	Männlich	47	1	5-ASA, Glukokortikoide, Tacrolimus	10	Linkskolitis (E2)
6	Weiblich	52	5	5-ASA, Glukokortikoide	8	Linkskolitis (E2)

3.1.4 Abbruchkriterien

Ein vorzeitiger Abbruch der Anwendungsbeobachtung konnte auf eigenen Wunsch des Patienten oder nach Entscheidung des Arztes beim unerwarteten oder vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen, fehlender Compliance oder ernsthaften medizinischen Problemen erfolgen.

3.1.5 Kontrollgruppe

Acht gesunde Probanden, welche als Vergleichsgruppe ausschließlich bei der Bestimmung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate dienten, spendeten nach Aufklärung über die Risiken und schriftlicher Einwilligung freiwillig eine geringe Menge Blut. Diese Gruppe, welche keine Apheresetherapie erhielt, setzte sich aus sieben Frauen und einem Mann zusammen und wies einen Altersdurchschnitt von 41,1 Jahren auf.

3.1.6 Das Immunopure® -Zytaphereseverfahren

Das bereits im Einleitungskapitel auf Seite 24 vorgestellte Verfahren Immunopure® der Firma Nikkiso Co., Ltd. (Kanzawa, Japan) wurde für die Anwendungsbeobachtung

verwendet. Vor der Anwendung am Menschen wurden Immunopure® -Adsorber *in vitro* und in Tierversuchen getestet. Im Jahr 2009 wurde das Immunopure® Zytapherese-Verfahren in einer Pilotstudie mit zehn medikamenten-refraktären Patienten mit einer aktiven Colitis ulcerosa zum ersten Mal klinisch angewendet [1].



Abb. 3 und 4: Immunopure® -Zytapheresesystem: Adsorber (links) und Blutmonitor (rechts).

3.1.7 Beobachtungsplan

Die Patienten wurden fünf Wochen lang einmal pro Woche mit der Immunopure®-Zytapherese behandelt. Die Anwendungsbeobachtung startete im November 2011 und dauerte bis zum Februar 2012.

3.1.7.1 Ablauf der Apheresetherapie

Alle Patienten erhielten eine fünfmalige Apheresebehandlung im Abstand von je einer Woche. Jede Apheresebehandlung dauerte 60 min bei einem Blutfluss von 30 ml/min.

Der Aufbau und die Vorbereitung des Adsorbers erfolgten nach der Gebrauchsinformation des Betreibers. Zu Beginn wurde der Adsorber mit 2 Litern isotonischer NaCl-Lösung (B.Braun Avitum AG, Melsungen, Deutschland) im Single-Pass-Modus gespült. Anschließend wurde der extrakorporale Kreislauf mit 500 ml isotonischer NaCl-Lösung gefüllt, zu welcher 5.000 IE unfractioniertes Heparin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) gegeben wurden. Um den Patienten an den extrakorporalen Kreislauf anzuschließen, waren zwei Punktions notwendig. Die Kanülen wurden vor der Behandlung in die Venen (antecubital) jeden Arms positioniert. Zentral-venöse Katheter wurden nicht verwendet. Unfraktioniertes Heparin wurde als Bolus (75-150 IU/kg Körpergewicht) zu Beginn der Behandlung und kontinuierlich (50-100 IU/kg pro Behandlung) infundiert. Die genaue Heparindosis wurde nach jeder Apherese dokumentiert. Erfolgte aufgrund eines

Maschinenalarms eine Unterbrechung der Apheresebehandlung, wurde die Zeit bis zum Fortsetzen der Therapie nicht in die effektive Behandlungszeit eingerechnet. Am Ende der Apheresebehandlung wurde das im System verbleibende Blut mit 250-500 ml physiologischer NaCl-Lösung dem Patienten reinfundiert. Nach Therapieende wurde der Patient routinemäßig noch für etwa 15 min (oder länger, wenn aus Sicht des diensthabenden Arztes notwendig) beobachtet.

3.1.7.2 Untersuchungsparameter

Vor, während und nach jeder Apherese erfolgte die Messung des Blutdruckes und der Herzfrequenz. Des Weiteren wurden Blutentnahmen vor, während und nach jeder Apheresetherapie durchgeführt. Folgende in Tabelle 8 dargestellten Laborparameter wurden untersucht:

Tab. 8: Untersuchungsparameter und Zeitpunkte der Probenentnahme.

	0 min	15 min Adsorberein- und - ausgang	60 min Adsorberein- und - ausgang	Ende
Großes Blutbild¹	x	x	x	x
Zelloberflächenmarker²	x	x	x	
Mikropartikel² CD42b ⁺ Annexin-V ⁺ Partikel (im Plasma)	x	x	x	
CD40L (im Plasma)²	x		x (nur Ausgang)	
P-Selektin (im Plasma)²	x		x (nur Ausgang)	

¹Therapie 1-5

umfasste Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten, Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile Basophile

²Therapie 1, 3, 5

umfasste CD3⁺CD4⁺ (T-Helfer-Zellen), CD3⁺CD8⁺ (zytotoxische T-Zellen), CD10⁺ (Granulozyten) CD14⁺ (Monozyten), CD62L⁺ (L-Selektin⁺ Zellen), CD11b⁺ (CD11b⁺ Zellen), CD3⁺TCRgCR⁺ (gCRllentktinn) T-Ze⁺ Zellen), CD3⁺HLADR⁺, (aktivierte T-Zellen, Spätphase) CD4⁺CD25⁺ (aktivierte T-Zellen, Frühphase) CD14⁺CD16⁺ (proinflammatorische Monozyten) CD42b⁺CD63⁺ (aktivierte Thrombozyten), CD42b⁺CD62P⁺ (aktivierte Thrombozyten) CD42b⁺CD14⁺ (Thrombozyten-Monozyten-Aggregate), CD42b⁺CD3⁺ (Thrombozyten-T-Zell-Aggregate), CD42b⁺CD11b⁺ (Thrombozyten-CD11b⁺-Zell-Aggregate)

Der klinische Aktivitätsindex nach Rachmilewitz [78] (CAI) wurde zu Beginn der Anwendungsbeobachtung und am Ende erhoben, um die klinische Wirksamkeit der Therapie zu beurteilen. Als klinisches Ansprechen wurde eine Minderung von drei Punkten, als Remission eine Punktestand von \leq vier Punkten definiert.

3.1.8 Evaluierung ein Jahr nach Ende der Anwendungsbeobachtung

Im Zeitraum von Juni bis Oktober 2013 (ca. 1,5 Jahre nach der Apheresebehandlung) erfolgte eine telefonische und schriftliche Kontaktaufnahme mit den sechs Patienten der Anwendungsbeobachtung. Diese konnten mittels Fragebogen ihre Erfahrungen mit der Zytapherese-Therapie wiedergeben (siehe Anhang). Eine mögliche Verbesserung/Verschlechterung der Krankheitssymptome nach der Zytapherese, die Dauer der Verbesserung, das aktuelle Befinden und die aktuelle Therapie wurden als Parameter erhoben. Von großer Bedeutung war auch die persönliche Einschätzung des Nutzens der Zytapherese-Therapie. Folgende Fragen waren von zentraler Bedeutung:

- Empfanden Sie die Zytapherese als sinnvolle Therapiemethode?
- Inwieweit haben Sie sich durch die Apheresesitzungen in Ihrer Lebensqualität eingeschränkt gefühlt?
- War dieser Aufwand im Vergleich zum Nutzen lohnenswert?
- Würden Sie diese Therapieform weiterempfehlen?

Des Weiteren war auf dem Fragebogen die Möglichkeit gegeben, Erfahrungen und Krankheitsgeschichte in freien Worten wiederzugeben.

3.2 Das in vitro Rezirkulationsmodell

3.2.1 Aufbau

Für das experimentelle Rezirkulationsmodell wurden statt der normalen Immunopure®-Module mit einem Volumen von 350 ml verkleinerte Module mit einem Volumen von 40 ml genutzt (Abb. 5). Das Verhältnis des Volumens des Original-Moduls zum Volumen des verkleinerten Moduls betrug 8,75:1.

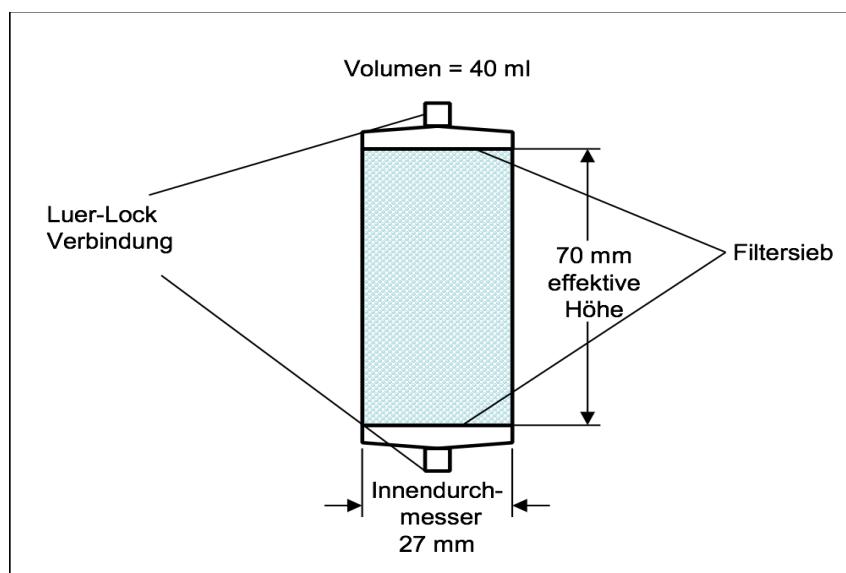


Abb. 5: Abmessungen des verkleinerten Adsorbermoduls.

Das Verhältnis von Höhe und Durchmesser war annähernd wie beim Original-Modul (2,6 im Vergleich zum Original 3,1). Die Querschnittsfläche des Immunopure®-Adsorbers beträgt $A = 27,3 \text{ cm}^2$. Die Kontaktzeit des Blutes mit den Adsorberkugeln ist abhängig von der Flussgeschwindigkeit v , welche sich aus der Flussrate Q ($30 \text{ cm}^3/\text{min}$) und der Querschnittsfläche des Adsorbers ergibt: $v = Q/A = 30 \text{ cm}^3/\text{min} \div 27,3 \text{ cm}^2 = 1,1 \text{ cm/min}$. Die Querschnittsfläche der 40 ml-Module betrug $5,7 \text{ cm}^2$. Daher wäre eine Flussrate von $Q = 6,3 \text{ ml/min}$ notwendig ($Q = A \cdot v$), um die gleiche Blutflussgeschwindigkeit wie beim Original-Modul zu erreichen. Da frühere Erfahrungen mit dem Rezirkulationsmodell zeigten, dass Blutflüsse unter $6,5 \text{ ml/min}$ häufig zu Sedimentationsprozessen in den Schläuchen und in den Modulen führten, wurde für die Versuche eine Blutflussgeschwindigkeit von $7,5 \text{ ml/min}$ gewählt. Die Minimodule wurden mit physiologischer Kochsalzlösung für mehrere Minuten gespült. Gesunden Probanden (drei Männer und drei Frauen), welche zuvor über mögliche Risiken und Nebenwirkungen aufgeklärt wurden und schriftlich ihr Einverständnis erklärten, wurden 500 ml Blut entnommen. Dieses wurde auf zwei Blutbeutel mit 1 IU Heparin/ml (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) aufgeteilt. Als Schlauchsystem dienten normale Sets für Infusionspumpen (Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland). Als Pumpenschlauch wurde ein Silikon-Schlauch für Schlauchpumpen mit einem Innendurchmesser von zwei Millimetern und einer Wanddicke von einem Millimeter verwendet (neoLab, Heidelberg, Deutschland). In einem 37° warmen Wasserbad mit Thermostat wurden die Blutbeutel kontinuierlich mittels Schüttler bewegt, um einer Sedimentation vorzubeugen. Mit einer Pumpe (Peristaltikpumpe "Cole Parmer Ismatec MC-360 B") wurde eine kontinuierliche Flussrate von $7,5 \text{ ml/min}$ erzeugt. Das Blut des einen Blutbeutels wurde durch ein Minimodul, welches Polyarylat-Resin-Kugeln aus einem Immunopure®-Adsorber enthielt, gepumpt (Abb. 4, 5). Das Blut des zweiten Beutels wurde durch ein Leermodul (Tropfammer mit gleichem Totvolumen wie Minimodul) geleitet. Nach nahezu vollständiger Verdrängung der physiologischen Kochsalzlösung durch das Blut wurde der Kreislauf geschlossen (Rezirkulation). Beide Kreisläufe wurden für 60 min parallel unter gleichen Bedingungen betrieben (Volumina, Blutflüsse, Temperatur, Module auf gleicher Höhe). Die 0 min -Probe (A_0) wurde erst entnommen, nachdem die Module vollständig mit Blut gefüllt waren. Weitere Probenentnahmen erfolgten nach 15 min sowie nach 60 min vor (A_{15}, A_{60} , Influx-Probe) und nach (V_{15}, V_{60} , Efflux-Probe) dem Modul. Es wurden die gleichen Parameter erhoben wie bei 3.1.7.2 beschrieben. Zusätzlich wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung der Polyarylat-Resin-Kugeln durchgeführt.

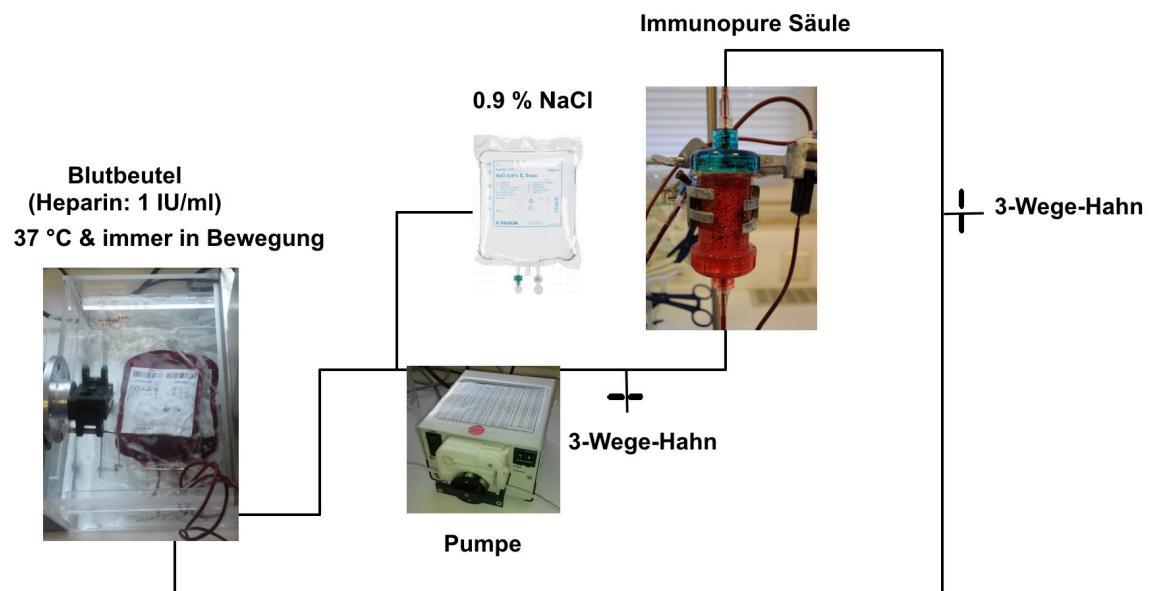


Abb. 6: Rezirkulationsmodell mit Immunopure[®]-Minimodul (gefüllt mit Polyarylat-Resin-Kugeln) mit einem Volumen von 40 ml. 250 ml heparinisiertes (1 IU/ml) Blut von einem gesunden Spender rezirkulierten durch das mit NaCl vorgespülte Modul bei einem Blutfluss von 7,5 ml/min und 37 °C für eine Untersuchungszeit von 60 min.

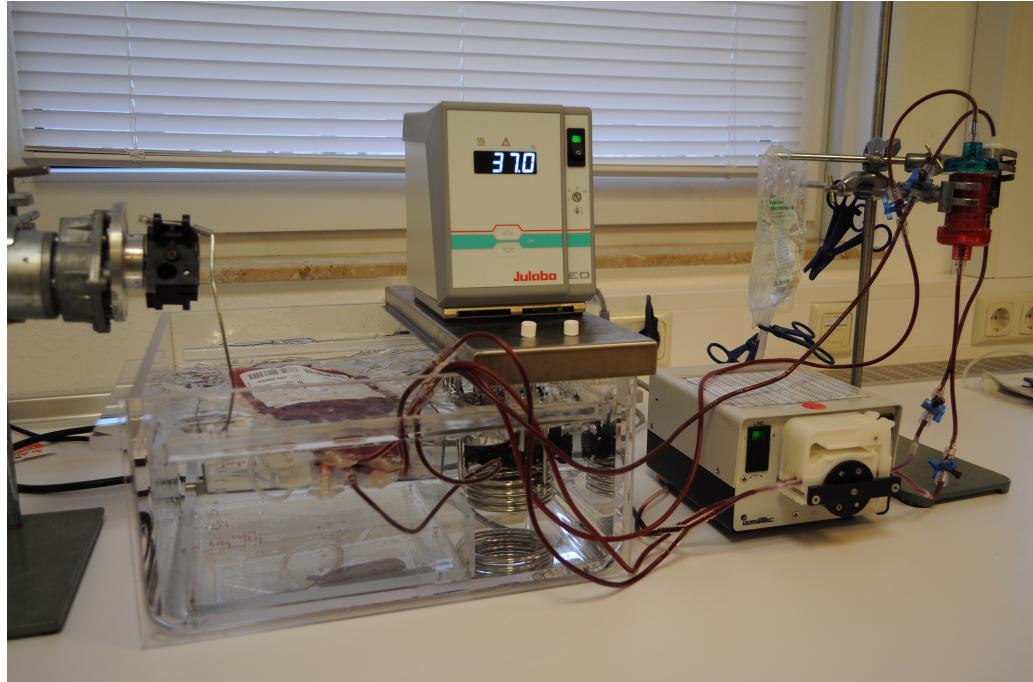


Abb. 7: Versuchsaufbau des Rezirkulationsmodells.

3.3 Methoden

3.3.1 Großes Blutbild

Sowohl bei der Anwendungsbeobachtung als auch im Rezirkulationsmodell wurde Blut in EDTA-Monovetten entnommen und ein großes Blutbild von einem externen, nach DIN IES 17025 zertifizierten Labor (Medizinisches Labor Rostock, Deutschland) mit Hilfe eines Sysmex-Automaten (SE-9000, Sysmex Corporation, Kobe, Japan) erstellt.

3.3.2 Durchflusszytometrie

3.3.2.1 Durchführung

Für die Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie (oder auch **Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS**) wurde das Gerät FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, USA) verwendet. Die für die Untersuchung relevanten CD-Antigene sind in Tab. 9 aufgeführt:

Tab. 9: Auflistung der humanen CD-Antigene [201]

Bezeichnung/ Isotyp	CD- Antigen	Exprimierende Zellen	Menge	Funktionen des Antigens
CD3 mIgG1	CD3	T-Zellen	5 µl	assoziiert mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen (TCR); notwendig für die Zelloberflächenexpression und Signalübertragung des TCR
CD4 mIgG1	CD4	T-Helferzellen	5 µl	Korezeptor für MHC-Klasse II Moleküle
CD8 mIgG1	CD8	zytotoxische T-Zellen	5 µl	Korezeptor für MHC-Klasse I Moleküle
CD10 mIgG2a	CD10	Granulozyten, unreife B-Zellen, lymphoide Vorläuferzellen	5 µl	membrangebundene Metalloprotease
CD11b mIgG1	CD11	Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen	5 µl	alpha-L-Untereinheit des Integrins LFA-1 (assoziiert mit CD18); bindet an CD54 (ICAM-1); CD102 (ICAM-2) und CD50 (ICAM-3)
CD14 mIgG2a	CD14	Monozyten	5 µl	Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid und lipopolysaccharidbindendem Protein
CD16 mIgG1	CD16	neutrophile Granulozyten, NK-Zellen, Monozyten/ Makrophagen	5 µl	Bestandteil des niedrig affigen Fc-Rezeptors (Fc-γ RIII; vermittelt Phagozytose und antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
CD25 mIgG1	CD25	aktivierte T-Zellen, B-Zellen, regulatorische T-Zellen	5 µl	α-Kette des IL-2-Rezeptors
CD42b mIgG1	CD42	Thrombozyten	5 µl	bindet VWF und Thrombin; wichtig für Adhäsion der Blutplättchen an verletzte Gefäße

CD62L mIgG1	CD62L	B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen	5 µl	Leukozytenadhäsionsmolekül; bindet CD34, GlyCAM; vermittelt das Entlangrollen am Endothel
CD62P mIgG1	CD62P	aktivierte Thrombozyten, aktivierte Endothelzellen	5 µl	Adhäsionsmolekül; bindet CD162 (PSGL-1); vermittelt die Interaktion zwischen Blutplättchen und Endothelzellen bzw. Monozyten sowie das Entlangrollen von Neutrophilen am Endothel
CD63 mIgG1	CD63	aktivierte Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen	5 µl	Lysosomales Membranprotein, das nach der Aktivierung an die Zelloberfläche verlagert wird
anti-TCR γδ mIgG1		T-Zellen	5 µl	γδ TCR
anti-HLA-DR mIgG2a		T-Zellen	2 µl	MHC Klasse II Oberflächenrezeptor

Zu 50 µl Vollblut wurden zuvor ausgetestete Mengen der entsprechenden Antikörper und Isotypkontrollen hinzugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Eine differenzierte Auflistung von verwendeten Antikörpern und Isotypkontrollen ist im Anhangsteil der Dissertation zu finden (siehe Anhangskapitel).

Für die Bestimmung der Thrombozytenmarker wurde Blut aus CTAD-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet, für alle anderen Untersuchungen Blut aus EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Nach Zugabe von 1 ml 1 x BD FACS Lysing Solution (BD Bioscience, San Jose, USA) und einer Inkubation von zehn Minuten bei Raumtemperatur zur Lyse der Erythrozyten erfolgte eine Zentrifugation (300 x g für 5 min; Mikro 200, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden einmal mit BD CellWash (BD Bioscience, San Jose, USA) gewaschen und nach Zugabe von 200 µl BD CellWash am Zytometer analysiert. Es wurden 20.000 bzw. 100.000 Leukozyten (bei den Markern CD3⁺γδ TCR⁺, CD3⁺HLADR⁺, CD86⁺CD14⁺CD16⁺, CD4⁺CD25⁺) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest (BD Bioscience, San Jose, USA).

3.3.3 Bestimmung zirkulierender Mikropartikel aus Thrombozyten

Die Untersuchung im Blut zirkulierender Mikropartikel aus Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie erfolgte in modifizierter Form nach Robert et al. [200]. Die Mikropartikel wurden nach folgenden Parametern definiert: < 0,9 µm (Vergleich mit Hilfe von Kugeln mit standardisiertem Durchmesser 0,5 µm, 0,9 µm, 3 µm; Megamix, Biocytex, Marseille, Frankreich), Annexin-V⁺ und CD42⁺. Annexin-V ist ein Ca²⁺-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin. Es bindet

an Phosphatidylserin, welches auf der Membranaußenseite apoptotischer Zellen exprimiert wird und bindet daher auch an Mikropartikel [202]. Für die Analyse wurde plättchenfreies Plasma verwendet. Vollblut (CTAD-Monovette) wurde nach Abnahme sofort zentrifugiert (600 x g für 10 min bei Raumtemperatur), bei -80 °C gelagert und nach dem Auftauen erneut zentrifugiert (5000 x g für 5 min bei Raumtemperatur). 30 µl des Überstandes wurden zu folgenden Ansätzen pipettiert:

1. 3 µl Annexin-V PE (BD Biosciences, San Diego, USA) + 17 µl Annexin-V Binding Buffer (1:10 in A. dest., sterilfiltriert) (BD Biosciences, San Diego, USA)
2. 5 µl CD42b FITC + 3 µl Annexin-V PE + 12 µl Annexin-V Binding Buffer
3. 15 µl Annexin-V Binding Buffer

Nach 30 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden 500 µl Binding Buffer hinzugegeben und die gesamte Lösung (550 µl) in Truecount-Röhrchen (BD Biosciences, San Jose, USA) gefüllt. In diesen Röhrchen befindet sich innerhalb eines Edelstahlankers ein lyophilisiertes Sediment mit fluoreszierenden Mikropartikeln definierter Größe und Anzahl, welches sich nach Kontakt mit der zu untersuchenden Suspension auflöst. Nach vorsichtigem Schütteln wurden die Proben am Durchflusszytometer analysiert. Die Mikropartikel-Region wurde mit Hilfe der Megamix-Kugeln (Biocytex, Marseille, Frankreich) definiert.

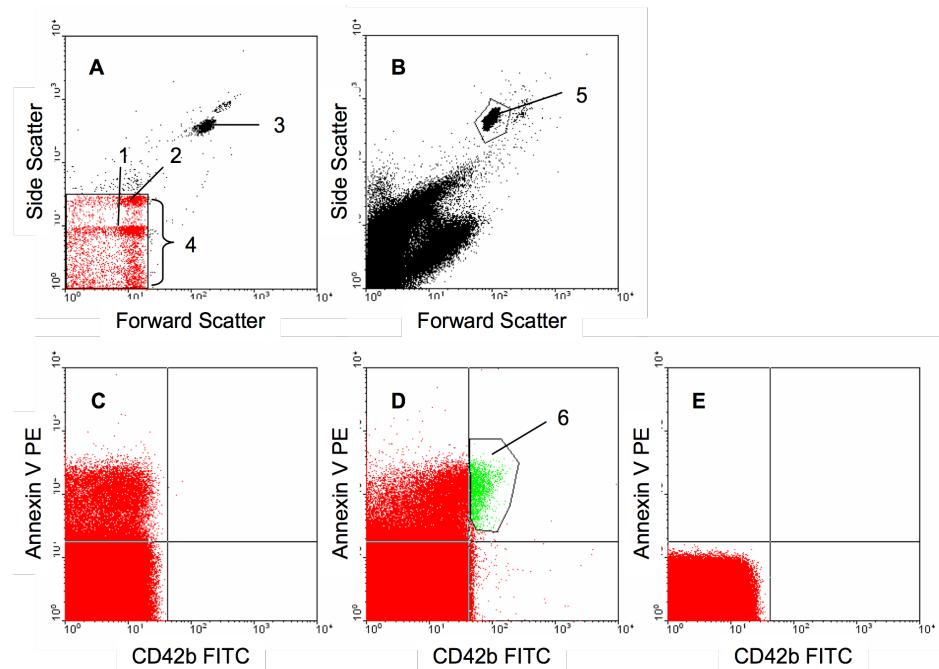


Abb. 8: Bestimmung zirkulierender Mikropartikel aus Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie. **A:** Megamix-Partikel zur Definition der Mikropartikel-Größe mit einem Durchmesser von 0,5 µm (1), 0,9 µm (2), 3 µm (3). Gate (4) wurde oberhalb der 0,9 µm Partikel definiert. **B:** Ermittlung der Zählpunkte der Truecount-Tubes pro Messung (Anzahl der Ereignisse in (5)). **C-E:** Aktivierung von Gate (4), **C:** Annexin-V PE-Färbung; **D:** CD42b FITC- und Annexin-V PE-Färbung, **E:** Kontrolle ohne Antikörper bzw. Annexin-V PE.

Die Messung wurde gestoppt, wenn 10.000 Zählpunkte der Truecount-Röhrchen (mit einem Life-Gate) erfasst waren oder wenn das Röhrchen leer war. Die absolute Anzahl an Mikropartikeln aus Thrombozyten kann mit folgender Formel ermittelt werden (die Gesamtzahl der Zählpunkte pro Test ist auf dem Etikett der Verpackung der Truecount-Röhrchen angegeben):

$$\text{Absolutzahl CD42b}^+ \text{Annexin V}^+ \text{ Partikel} = \frac{\frac{\text{Anzahl gemessener CD42b}^+ \text{Annexin V}^+ \text{ Partikel}}{\text{Anzahl gemessener Zählpunkte}} \times \frac{\text{Gesamtzahl der Zählpunkte im gesamten Röhrchen}}{\text{Testvolumen (550 } \mu\text{l)}}}{}$$

3.3.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.3.4.1 P-Selektin-Nachweis im Plasma

Es wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA-Kit der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) verwendet. Alle Schritte wurden nach Firmenvorschrift durchgeführt.

Vollblut mit EDTA als Antikoagulanz wurde sofort nach Abnahme zentrifugiert (10 min, 600 x g, 4 °C), das Plasma wurde abpipettiert und bei -80 °C eingefroren. Alle Proben einschließlich der Positivkontrolle (Kitbestandteil) wurden 1:20 in Sample Diluent (Kitbestandteil) vorverdünnt. 100 µl der vorbereiteten Standards (Kitbestandteil), Kontrollen und Proben wurden in jedes Loch der ELISA-Platte pipettiert. Danach wurden 100 µl des verdünnten Konjugates (Kitbestandteil) in jedes Loch gegeben. Die Platte wurde bedeckt und für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (MTS4, Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik, Staufen i. Br., Deutschland) bei 450 U/min inkubiert. Anschließend wurde die Platte geleert und mit 300 µl Waschpuffer (Kitbestandteil) pro Loch viermal gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Substratlösung (Kitbestandteil) erfolgte eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Dann wurden 100 µl Stopplösung (Kitbestandteil) in jedes Loch gegeben. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Readers (anthos htIII, anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland) bei 450 nm.

3.3.4.2 CD40 Ligand-Nachweis im Plasma

Es wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA-Kit der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) verwendet. Alle Schritte wurden nach Firmenvorschrift durchgeführt.

Vollblut mit EDTA als Antikoagulanz wurde sofort nach Abnahme zentrifugiert (10 min, 600 x g, 4 °C), das Plasma wurde abpipettiert und bei -80 °C eingefroren. Eine zusätzliche Zentrifugation zur Gewinnung Plättchen-freien Plasmas wurde bei 10.000 x g für 10 min bei 4 °C nach dem Auftauen vor Beginn des Assays durchgeführt.

100 µl der Verdünnungslösung RD1-65 (Kitbestandteil) wurden in jedes Loch der ELISA-Platte gegeben. Nach Zugabe von 100 µl der vorbereiteten Standards (Kitbestandteil) und

Proben pro Loch wurde die Platte verschlossen und für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 450 U/min inkubiert. Anschließend wurde die Platte viermal mit je 400 µl Waschpuffer (Kitbestandteil) pro Loch gewaschen. Danach wurden 200 µl des Konjugates (Kitbestandteil) in jedes Loch pipettiert. Die Platte wurde bedeckt und für zwei Stunden unter Schütteln (450 U/min) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden 200 µl der Substratlösung (Kitbestandteil) in jedes Loch gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur und anschließend die Zugabe von 50 µl Stopplösung (Kitbestandteil) in jedes Loch. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Readers (anthos htIII, anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland) bei 450 nm.

3.3.5 Immunfluoreszenz

Nach Ende des Rezirkulationsversuches wurden einige Polyarylat-Resin-Kugeln aus dem Minimodul entnommen und in einer 3 %igen Paraformaldehyd-Lösung in PBS (phosphate buffered saline) (Dulbecco's PBS 1 x, PAA, Pasching, Österreich) 10 min lang auf Eis fixiert. Nach dreimaligem Waschen folgte eine Blockierung mit 2 % BSA (Bovine Serum Albumin) in PBS bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte in 2 % BSA in PBS bei 4°C für 16 Stunden (Tab. 11).

Tab. 10: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
anti-human CD42b	Maus, monoklonal	1:200	BD Biosciences, San Diego, USA
anti-human CD42b	Kaninchen, polyklonal	1:200	abcam, Cambridge, Großbritannien
anti-human Fibrinogen gamma Kette	Kaninchen, polyklonal	1:200	abcam, Cambridge, Großbritannien
anti-human CD14	Maus, monoklonal	1 : 200	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
anti-human CD11b	Maus, monoklonal	1 : 200	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
anti-human CD3	Maus, monoklonal	1 : 200	Immunotools, Friesoythe, Deutschland

Die Proben wurden dreimal mit 0,2 % BSA in PBS gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper in 2 % BSA in PBS im Dunkeln bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Danach wurden die Proben dreimal mit 0,2 % BSA in PBS gewaschen und in

PBS überführt. Ein Teil der Polyarylat-Resin Kugeln wurde auf spezielle Zellkulturschalen mit Deckgläschchen am Boden aufgetragen (Coverglass-bottom dish, SPL Life Sciences, Co., Ltd. Korea). Die Analyse der Partikel erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Fluoview FV10i, Olympus America Inc., Center Valley, USA). Als Kontrollen dienten Proben ohne Primärantikörper sowie Partikel, die keinen Kontakt mit Blut hatten, bei denen aber die vollständige Färbeprozessur durchgeführt wurde.

Tab. 11: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
anti-Maus Alexa 546	Ziege	1:1000	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
anti-Kaninchen Alexa 488	Ziege	1:1000	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.3.6 Hämatokrit-Korrektur

Aufgrund von Veränderungen des Hämatokrit-Wertes während der Behandlungen wurden Plasmakonzentrationen nach folgender Formel korrigiert [van Beaumont]:

$$C_{corr} = C^* (Hct_0/Hct_n) * (1-Hct_n)/(1-Hct_0)$$

Für Vollblut-Messungen (Blutbild und Durchflusszytometrie) wurde die folgende Formel angewendet:

$$C_{corr} = C^* Hct_0 / Hct_n$$

Hct₀ = Hämatokrit vor Behandlung

Hct_n = Hämatokrit zur Probenentnahmezeit n

3.3.7 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung erfolgte mit Excel 2003 und SPSS Version 22 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland). Die Daten sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert/Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Statistische Analysen wurden mit dem Wilcoxon-Test (gepaarte Stichproben) oder mit dem Mann-Whitney U-Test (ungepaarte Stichproben) durchgeführt. P-Werte von < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

IV Ergebnisse

4.1 Das in-Vitro Rezirkulationsmodell

4.1.1 Wirkung auf Blutzellen

Das Rezirkulationsmodell bestand aus zwei getrennten Kreisläufen mit Blut vom gleichen Spender. Zum einen wurde die Wirkung von Immunopure®-Adsorberkugeln auf Blutzellen durch eine Passage mit Hilfe eines „Minimoduls“ untersucht. Außerdem gab es einen zweiten Kreislauf, in welchem das Blut durch eine leere Säule („Leermodul“) floss. Wie in der Anwendungsbeobachtung wurden in beiden Kreisläufen nach 15 min und nach 60 min Blutproben vor und nach der Passage durch das Minimodul bzw. Leermodul entnommen.

4.1.1.1 Wirkung der Apherese mittels Immunopure®-Minimodul und Leermodul auf das Blutbild

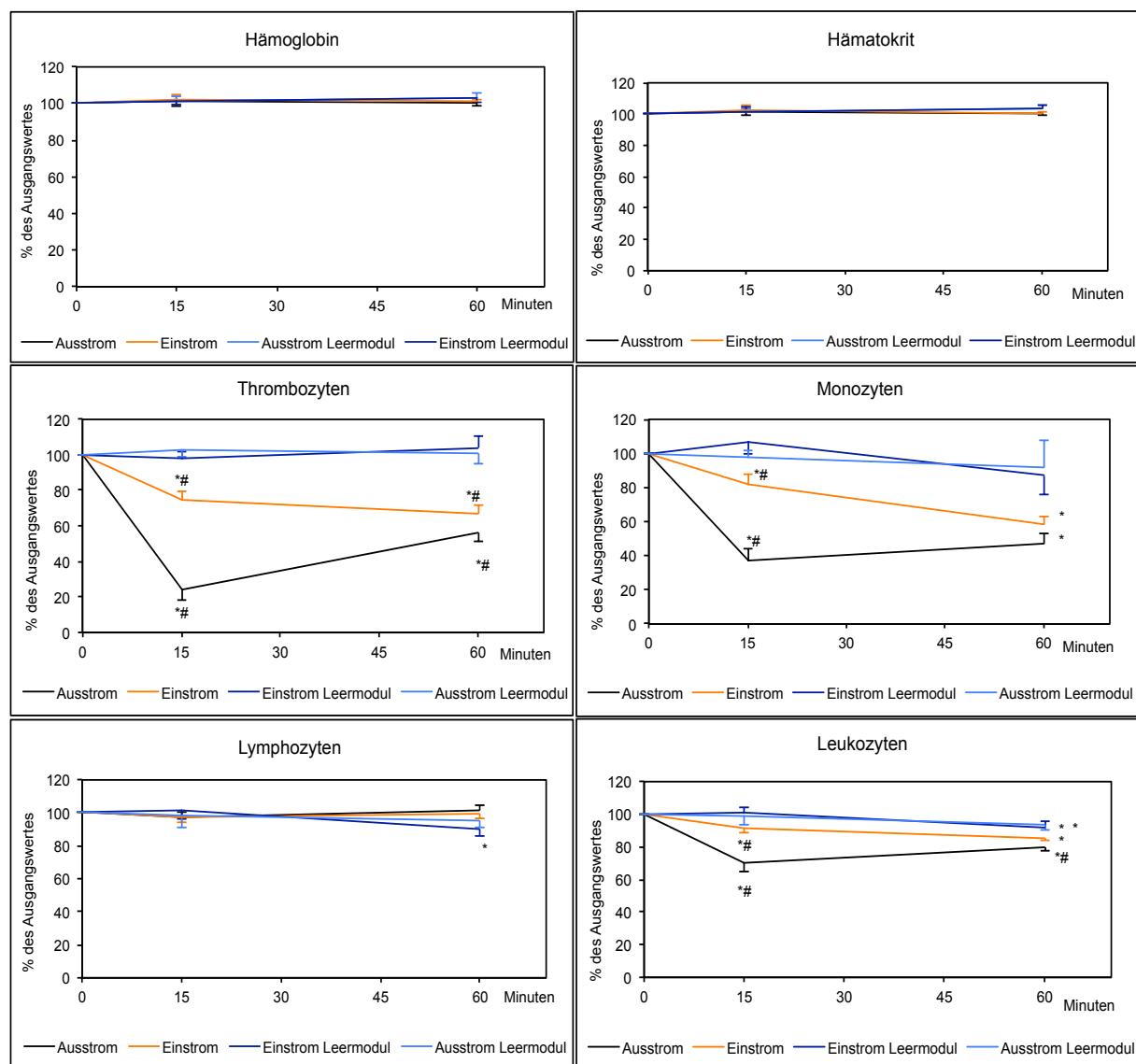


Abb. 9 A - F: Wirkung der Module auf Hämoglobin (A), Hämatokrit (B), Thrombozyten (C), Monozyten (D), Lymphozyten (E), Leukozyten (F) - gemessen in Ein- und Ausstrom nach 15 min und 60 min im Minimodul und Leermodul. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test ($n=6$) ($^*P<0,05$) und mit den Werten der Leermodule ($n=6$) mittels U-Test ($\# P<0,05$).

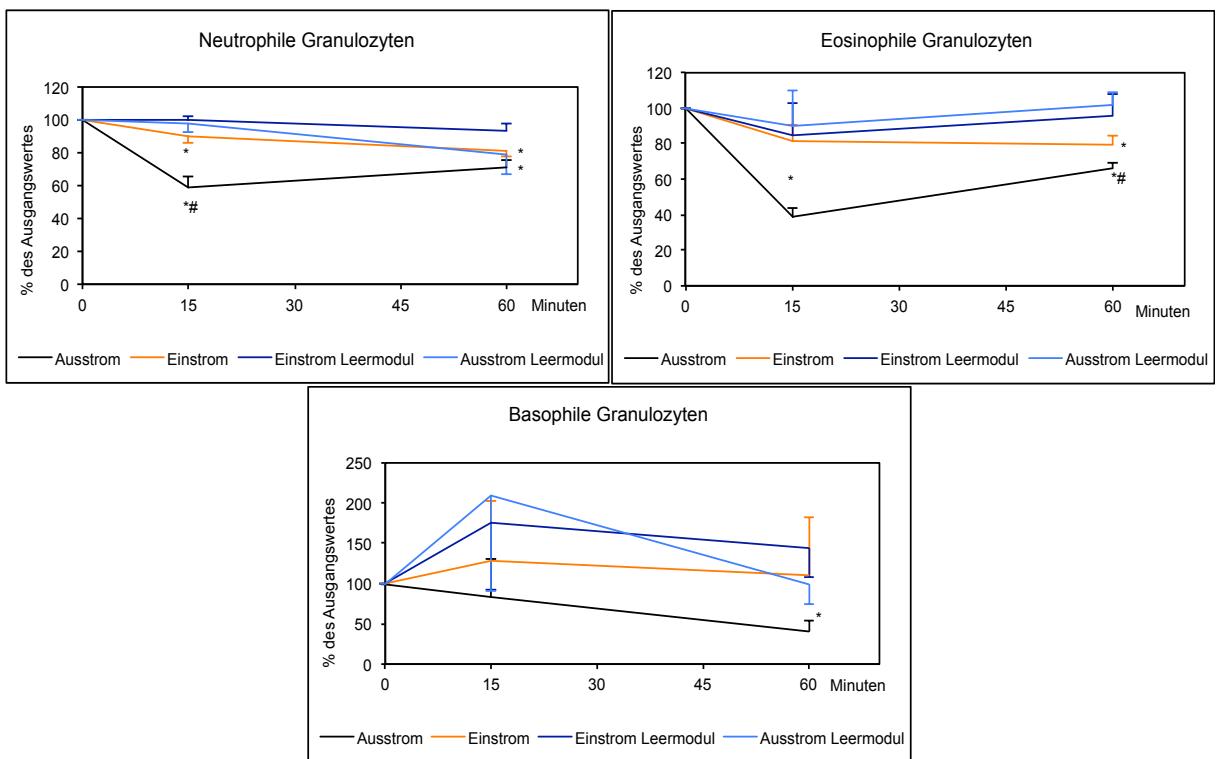


Abb. 9 G-I: Wirkung der Module auf neutrophile Granulozyten (G), eosinophile Granulozyten (H), basophile Granulozyten (I) - gemessen in Ein- und Ausstrom nach 15 und 60 min im Minimodul und Leermodul. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test ($n=6$) (* $P<0,05$) und mit den Werten der Leermodule ($n=6$) mittels U-Test (# $P<0,05$).

Die in den Abbildungen aufgeführten Graphen zeigen die Veränderungen der einzelnen Zellarten des Blutbildes während der Rezirkulationsversuche. Hämoglobin und Hämatokrit veränderten sich in dem Rezirkulationsmodell weder im Immunopure®-Minimodul noch im Leermodul signifikant. Bei den Thrombozyten zeigte sich ein signifikanter starker Abfall nach 15 min auf 23,7% und nach 60 min auf 56,6% des 0-Wertes im Ausstrom des Minimoduls. Auch im Einstrom konnten signifikante Reduzierungen erhoben werden: auf 74,9 % des 0-Wertes nach 15 min und 66,7 % des 0-Wertes nach 60 min. Im Leermodul gab es keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum 0-Wert. Die Zahl der Monozyten wurde bei Zirkulation durch das Minimodul signifikant reduziert auf 36,8% des 0-Wertes nach 15 min im Ausstrom des Minimodules und auf signifikante 46,7% des 0-Wertes im Ausstrom des Minimodules nach 60 min. Auch im Einstrom war die Reduktion der Monozyten nach 15min (81,8% des 0-Wertes) und 60min (58,5% des 0-Wertes) signifikant. Im Leermodul gab es keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum 0-Wert. Bei den Lymphozyten zeigte sich lediglich im Einstrom des Leermoduls nach 60 min eine signifikante Reduzierung (90,2% des 0-Wertes). Die weiteren Messungen ergaben nicht signifikante Veränderungen: im Minimodul zeigte sich nach 15 min verglichen mit dem 0-Wert eine Reduzierung auf 97,1% des 0-Wertes im Einstrom und 96,9% im Ausstrom. Nach 60 min konnten im Einstrom 99,5% des 0-Wertes im Einstrom und 101,1 % im Ausstrom detektiert werden.

Nur geringe, aber signifikante Veränderungen zeigten sich bei den Leukozyten: Hier betrug die Zellzahl im Ausstrom des Minimoduls nach 15 min 70% des 0-Wertes und nach 60 min 79,4% des 0-Wertes. Im Einstrom des Minimoduls betrug die Anzahl der Leukozyten nach 15 min 91,2 % und nach 60 min 85,3 % des 0-Wertes. Alle vier Messungen ergaben signifikante Reduzierungen. Im Leermodul zeigten sich nach 15 min weder im Einstrom (101,3% des 0-Wertes), noch im Ausstrom (100,9% des 0-Wertes) signifikante Veränderungen im Vergleich zum 0-Wert. Nach 60 min stellten sich jedoch signifikante Reduzierungen der Leukozytenzahl auf 91,8% des 0-Wertes im Einstrom und 93,5% des 0-Wertes im Ausstrom des Leermoduls dar.

Die Zahl der Neutrophilen Granulozyten betrug im Einstrom des Minimoduls nach 15 min 90% und nach 60 min 81,1% des 0-Wertes. Durch die Passage des Minimoduls sank die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten nach 15 min auf 58,3% und nach 60min auf 71,5% des 0-Wertes. Die Veränderungen waren dabei alle signifikant. Im Leermodul gab es keine signifikanten Reduzierungen im Vergleich zum 0-Wert.

Die Zahl der eosinophilen Granulozyten wurde durch das Immunopure®-Minimodul signifikant reduziert auf 39% des 0-Wertes nach 15 min und 66,4% des 0-Wertes nach 60min (gemessen im Ausstrom - ebenfalls signifikant). Im Einstrom des Minimoduls zeigte sich eine Reduzierung auf 81,2% des 0-Wertes nach 15 min (nicht signifikant) und 79% des 0-Wertes nach 60 min (signifikant). Im Leermodul gab es keine signifikanten Reduzierungen im Vergleich zum 0-Wert. Die Anzahl der basophilen Granulozyten sank nach 15 min im Ein- und Ausstrom des Minimoduls nicht signifikant. Signifikant war lediglich die Reduzierung der basophilen Granulozyten nach 60min im Ausstrom des Minimoduls im Vergleich zum 0-Wert (39,8% des 0-Wertes). Nach 15 min betrug die Zellzahl 128,61% des 0-Wertes im Einstrom und 84,40% des 0-Wertes im Ausstrom des Minimoduls. Im Leermodul waren die Veränderungen nicht signifikant im Vergleich zum 0-Wert.

4.1.1.2 Wirkung auf Oberflächenmarker:

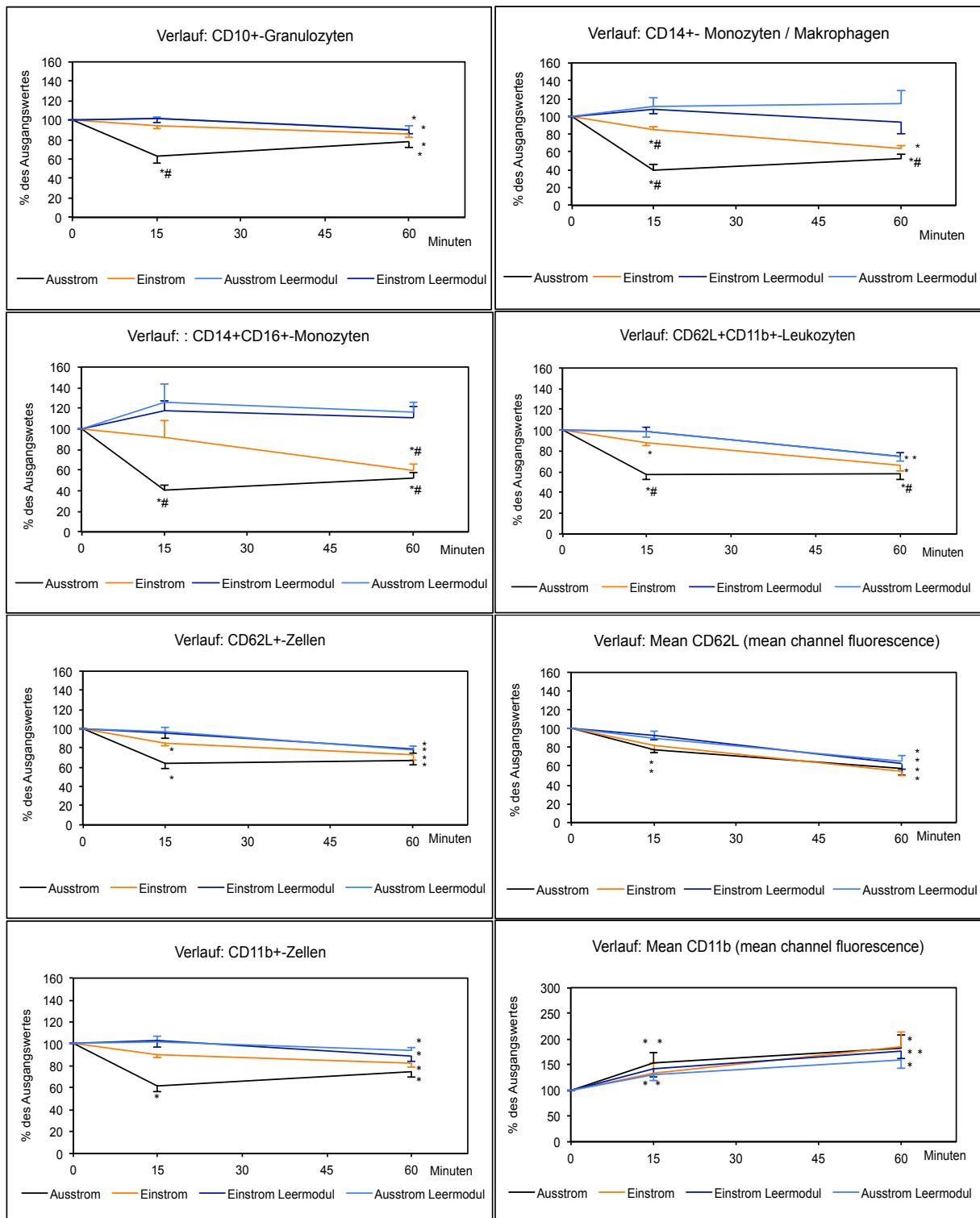


Abb. 10 A-H : Durchflusszytometrie-Analysen von CD10+-Granulozyten (A), CD14+-Monozyten / Makrophagen (B), CD14+CD16+-Monozyten (C), CD62L+CD11b+-Leukozyten (D), CD62L+-Zellen (E), Mean-CD62L-Zellen (F), CD11b+-Zellen (G) und MeanCD11b-Zellen (H) - gemessen in Einstrom und Ausstrom nach 15 und 60 min im Minimodul und Leermodul. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test ($n=6$) ($*P<0,05$) und mit den Werten der Leermodule ($n=6$) mittels U-Test ($\# P<0,05$).

Bei den *in vitro* Versuchen zeigte sich eine eliminierende Wirkung des Immunopure®-Minimoduls auf CD10+-Granulozyten und CD14+-Makrophagen/-Monozyten.

CD10+-Granulozyten wurden in ihrer Anzahl signifikant durch die Adsorberpassage im Ausstrom des Minimodules auf 65,5% des 0-Wertes nach 15 min und signifikant auf 77,6% des 0-Wertes nach 60 min reduziert. Im Einstrom zeigte sich lediglich nach 60min eine signifikante Reduzierung auf 85,8% des 0-Wertes. Im Leermodul zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im Ein- und Ausstrom. CD14+-Makrophagen/-Monozyten konnten sowohl im Einstrom des Minimoduls nach 15 min signifikant auf 84,5% und nach 60 min signifikant auf 63,3% des 0-Wertes reduziert werden. Nach Adsorberpassage konnte die Anzahl der Zellen signifikant auf 39% des 0-Wertes nach 15 min und 52,5% nach 60 min reduziert werden (gemessen im Ausstrom). Im Leermodul gab es keine signifikanten Veränderungen. CD14+CD16+-Monozyten wurden durch das Minimodul im Einstrom nach 15 min auf nicht signifikante 91,3% und nach 60 min auf signifikante 59,6% des 0-Wertes reduziert. Die Messungen im Ausstrom erbrachten eine signifikante Reduzierung auf 40,5% nach 15 min und 51,9% des 0-Wertes nach 60 min. Die Veränderungen im Leermodul waren nicht signifikant. CD62L+-Zellen wurden signifikant auf 85,8% des 0-Wertes nach 15 min und 72,3% nach 60 min im Einstrom - sowie 63,7% nach 15 min und 67,4% nach 60 min im Ausstrom des Minimoduls reduziert (alle Messungen signifikant). Im Leermodul zeigten sich signifikante Reduzierungen nach 60 min im Ein- und Ausstrom auf 78,4% (Einstrom) und 78,1% (Ausstrom). Nach 15 min zeigten sich im Leermodul keine signifikanten Veränderungen in Ein- und Ausstrom.

Die Reduzierung der Mean CD62L+-Zellen war bei allen Messungen im Ein- und Ausstrom des Minimoduls signifikant. Im Einstrom nach 15 min auf 82,6% und nach 60 min auf 54,5% des 0-Wertes. Im Ausstrom betrug die Reduzierung nach 15 min 77,6% und nach 60 min 57,2% des 0-Wertes. Im Leermodul waren die Veränderungen nach 60 min signifikant bei 62,9% des 0-Wertes im Einstrom und 65,3% des 0-Wertes im Ausstrom. Nach 15 min zeigten sich im Leermodul keine signifikanten Veränderungen.

Bei den CD62L+CD11b+Leukozyten wurden im Minimodul sowohl im Einstrom nach 15 min (88,3% des 0-Wertes) und 60 min (65,8% des 0-Wertes), als auch nach Adsorberpassage im Ausstrom (nach 15 min 57,3%, nach 60 min 57,7% des 0-Wertes) signifikante Reduzierungen festgestellt. Im Leermodul zeigten sich nur nach 60 min signifikante Verringerungen: im Einstrom 74,8% und im Ausstrom 74,6% des 0-Wertes.

Bei CD11b+-Zellen war nach 15min eine signifikante Verringerung im Ausstrom des Minimoduls zu erheben auf 61,2% des 0-Wertes. Die Verringerungen nach 15min im Einstrom (90,6%) als auch in Einstrom und Ausstrom des Leermoduls nach 15 min (102,6% und 101,4% des 0-Wertes) waren nicht signifikant. Nach 60min war eine signifikante Verringerung sowohl im Einstrom und Ausstrom des Minimoduls (82,2% und 74,3% des 0-Wertes), als auch des Leermoduls (88,8% im Einstrom und 93,3% im Ausstrom) zu erheben. Die Anzahl Mean CD11b-Marker wurden durch die Zirkulation sowohl mit Minimodul als auch mit Leermodul signifikant erhöht: im Minimodul zeigte sich nach 15 min ein signifikanter Anstieg auf 132,9% im Einstrom und 153,5% des 0-Wertes im Ausstrom. Nach 60 min betrug der Anstieg signifikante 185,7% im Einstrom und signifikante 181,7% im Ausstrom. Im Leermodul konnte nach 15 min ebenso ein

signifikanter Anstieg auf 142,4% im Einstrom und 131,5% im Ausstrom erhoben werden. Nach 60 min zeigte sich der Anstieg weiterhin signifikant mit im Einstrom 176,1% und im Ausstrom 159% des 0-Wertes.

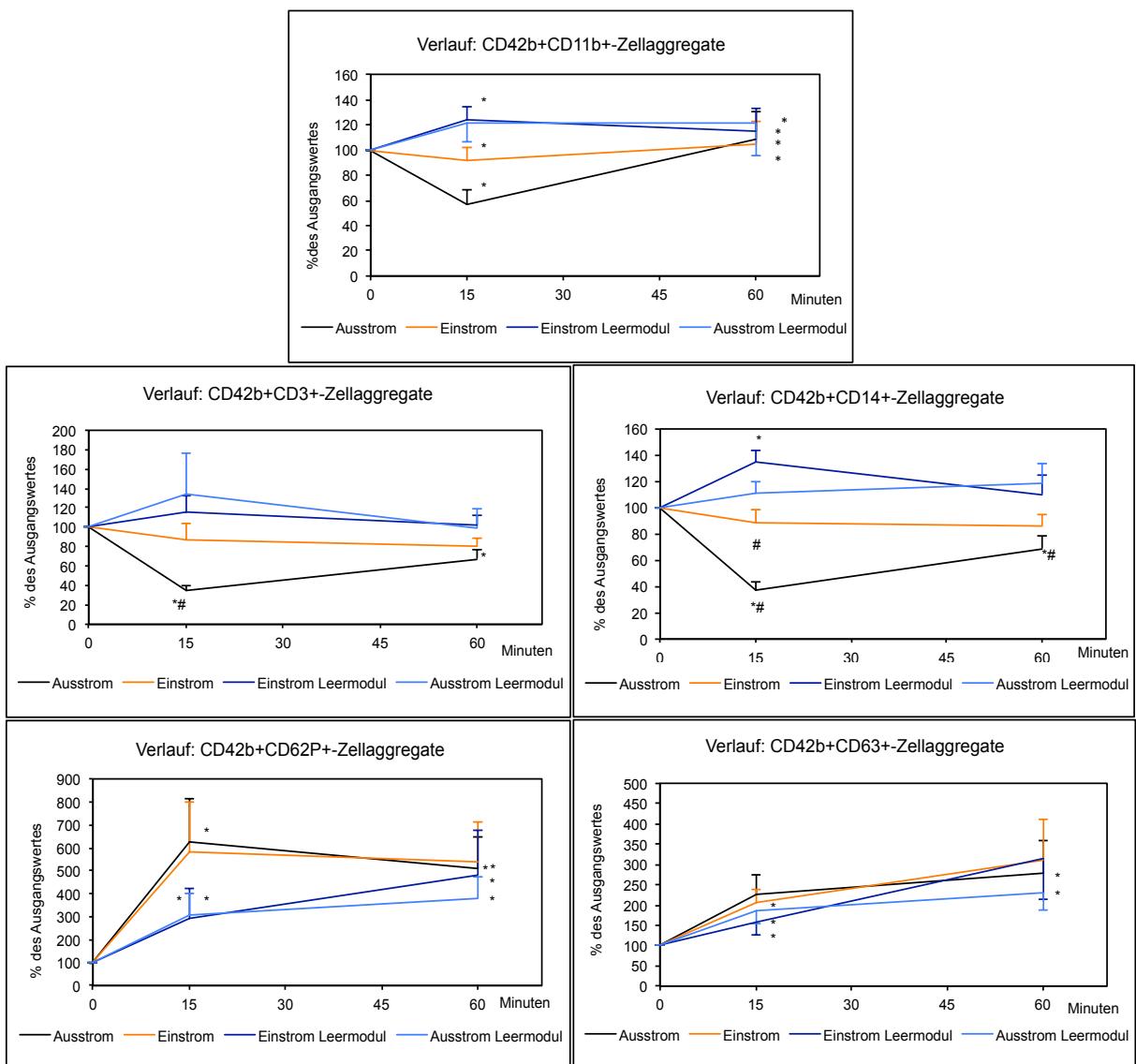


Abb. 10 I-M: Durchflusszytometrie-Analysen von CD42b+CD11b+- (I), CD42b+CD3+- (J), CD42b+CD14+- (K), CD42b+CD62P+- (L), CD42b+CD63+-Zellaggregaten (M) - gemessen in Ein- und Ausstrom nach 15 und 60 min im Minimodul und Leermodul. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test (n=6) (*P<0,05) und mit den Werten der Leermodule (n=6) mittels U-Test (# P<0,05).

Des Weiteren wurde ex vivo die Wirkung der Minimodule auf sogenannte Plättchen-Leukozyten Komplexe (Zellaggregate) untersucht. Bei CD42b+CD11b+-Zellkomplexen fand sich lediglich nach 15min im Ausstrom des Minimoduls eine signifikante Reduzierung von CD42b+CD11b+-Zellkomplexen auf 56,4% des 0-Wertes. Im Einstrom nach 15 min (91,3% des 0-Wertes), sowie im Ausstrom nach 15 min (105% des 0-Wertes) und 60 min (109,1% des 0-Wertes) zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Im Leermodul zeigte sich ein signifikanter Zuwachs der CD42b+CD11b+-Zellkomplexe nach 15min im Einstrom auf 123,50% des 0-Wertes. Die weiteren Veränderungen waren nicht signifikant

(121,41% des 0-Wertes im Ausstrom nach 15min, nach 60 min im Einstrom 114,34% des 0-Wertes und im Ausstrom 121,1% des 0-Wertes). CD42b+CD3+-Zellaggregate konnten durch die Adsorberpassage im Minimodul auf signifikante 34,2% des 0-Wertes nach 15 min und signifikante 67,6% nach 60 min reduziert werden (gemessen im Ausstrom). Im Einstrom, sowie im Leermodul waren die Reduzierungen nicht signifikant. Die Zahl der CD42b+CD14+-Zellaggregate reduzierte sich nach 15 min im Einstrom des Minimoduls auf signifikante 88,08% des 0-Wertes. Nach Adsorberpassage zeigte sich eine signifikante Reduzierung auf 36,9% des 0-Wertes. Nach 60 min konnten im Einstrom 85,5% des 0-Wertes (keine signifikante Reduzierung) dargestellt werden - nach Adsorberpassage betrug die Zahl der CD42b+CD14+-Zellaggregate im Ausstrom 69% des 0-Wertes (signifikante Reduzierung). Im Leermodul zeigte sich lediglich nach 15 min eine signifikante Veränderung der Zellaggregate: es kam zu einem Anstieg auf 134,59% des 0-Wertes. Durch die Rezirkulation im Minimodul erhöhte sich die Zellzahl von CD42b +CD62P+-Zellaggregate im Minimodul als auch im Leermodul: Die Zahl der CD42b +CD62P+-Zellaggregate betrug im Minimodul 584,4% des 0-Wertes nach 15min und 535,9% nach 60min im Einstrom - im Ausstrom 625,7% nach 15min und 509,9% nach 60min. Die Veränderungen in allen Messungen waren dabei signifikant. Im Leermodul betrug die Zahl der Zellaggregate 292,8% des 0-Wertes im Einstrom nach 15 min und 481,6% nach 60 min, im Ausstrom 308,7% nach 15min und 377,1% nach 60min. Hier waren ebenfalls alle Messungen signifikant. Die Zahl der CD42b+CD63+-Zellaggregate betrug im Einstrom des Minimoduls nach 15 min 207,4%, und im Ausstrom 225,4% des 0-Wertes (signifikante Messergebnisse). Nach 60 min zeigten sich 310,5% des 0-Wertes im Einstrom und 276,9% im Ausstrom (signifikante Veränderungen). Im Leermodul stieg die Zahl der Zellen ebenfalls - im Einstrom auf nicht signifikante 158,43% des 0-Wertes nach 15min und signifikante 313,51% des 0-Wertes nach 60min. Im Ausstrom betrug die Zahl 187,22% nach 15min und 231,02% nach 60min. Die Veränderungen im Ausstrom nach 60 min waren signifikant.

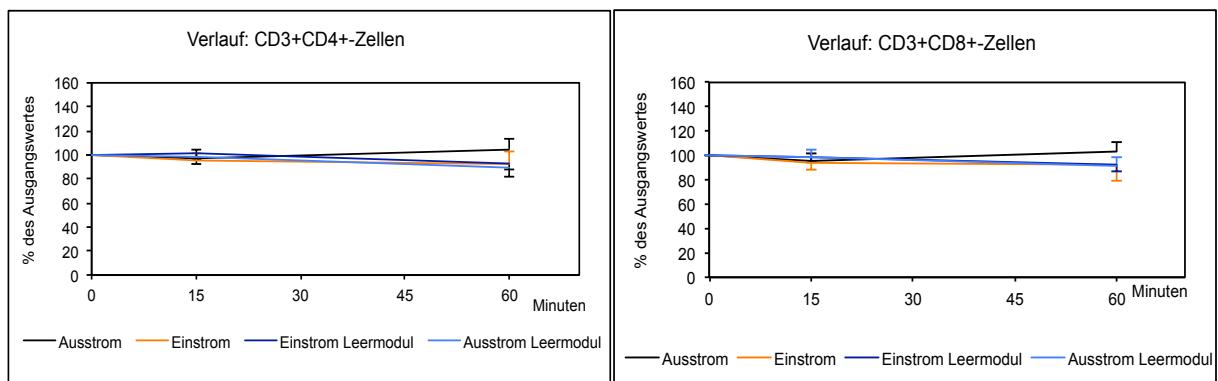


Abb. 10 N-O: Durchflusszytometrie-Analysen von CD3+CD4+- (N), CD3+CD8+-Zellaggregate (O) - gemessen in Ein- und Ausstrom nach 15 und 60 min im Minimodul und Leermodul. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test (n=6)(*P<0,05) und mit den Werten der Leermodule (n=6) mittels U-Test (# P<0,05).

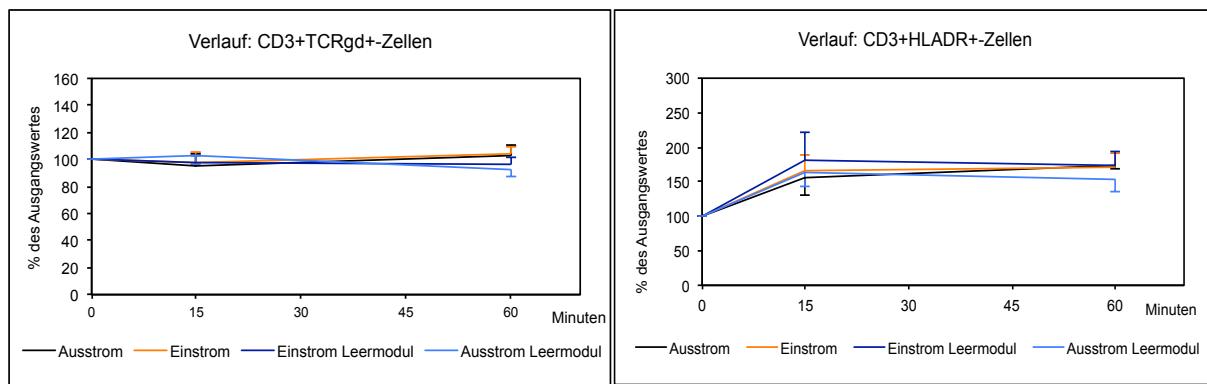


Abb. 10 P-Q: Durchflusszytometrie-Analysen von CD3+TCRgd+- (P), CD3+HLADR+-Zellaggregate (Q) - gemessen in Ein- und Ausstrom nach 15 und 60 min im Minimodul und Leermodul. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test ($n=6$) ($*P<0,05$) und mit den Werten der Leermodule ($n=6$) mittels U-Test ($\# P<0,05$).

Es konnte keine signifikante Wirkung der Immunopure®-Adsorberkugeln auf CD3+CD4+-, CD3+CD8+-, sowie CD3HLADR+ oder CD3+TCRgd+-Zellaggregate im Ein- und Ausstrom des Minimoduls festgestellt werden. Auch im Ein- und Ausstrom des Leermoduls zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Bei der Messung der CD3+CD4+-Zellaggregate zeigten sich nach 15 min im Einstrom des Minimoduls 95,35% und im Ausstrom 97,12% des 0-Wertes. Nach 60 min konnten 91,67% des 0-Wertes im Einstrom und 105,14% des 0-Wertes im Ausstrom detektiert werden. Beim Leermodul betrug die Zahl der Zellaggregate im Einstrom nach 15 min 100,68% und im Ausstrom 98,41% des 0-Wertes. Nach 60 min zeigten sich im Einstrom 92,85% und im Ausstrom 88,97% des 0-Wertes. Die CD3+CD8+-Zellaggregate wurden im Minimodul nach 15 min im Einstrom auf 93,76% des 0-Wertes reduziert und im Ausstrom auf 94,84%. Nach 60 min konnten im Einstrom 91,96% und im Ausstrom 103,09% des 0-Wertes detektiert werden. Beim Leermodul zeigte sich nach 15 min eine leichte Reduktion auf 99,34% des 0-Wertes im Einstrom und 99,25% des 0-Wertes im Ausstrom. Nach 60 min konnte eine Reduktion auf 92,43% des 0-Wertes im Einstrom und 91,47% des 0-Wertes im Ausstrom erhoben werden. Die Zahl der CD3+TCRgd+-Zellaggregate zeigte sich nach 15 min leicht reduziert bei 97,44% des 0-Wertes im Einstrom und 95,22% im Ausstrom. Nach 60min stieg die Zahl der Zellaggregate auf 103,86% des 0-Wertes im Einstrom und 102,51% im Ausstrom an. Im Leermodul war eine leichte Reduzierung nach 15min auf 97,41 % des 0-Wertes im Einstrom und ein leichter Anstieg 103,01 % des 0-Wertes im Ausstrom zu erheben. Nach 60 min war eine Reduzierung auf 96,14% des 0-Wertes im Einstrom und 92,51% im Ausstrom zu erheben. Bei der Messung der CD3+HLADR+-Zellaggregate zeigte sich nach 15 min im Einstrom ein Anstieg auf 165,43% des 0-Wertes und im Ausstrom auf 155,81% des 0-Wertes. Nach 60 min ließ sich im Einstrom 171,85% und im Ausstrom 174,54% des 0-Wertes nachweisen. Im Leermodul zeigte sich ebenso eine Zunahme der Zellaggregate: nach 15 min im Einstrom 181,4 % des 0-Wertes und im

Ausstrom 163,76% - nach 60 min konnte weiterhin eine Zunahme auf 173,65 % des 0-Wertes im Einstrom und 153,93% im Ausstrom festgestellt werden.

4.1.1.3 Wirkung auf Mikropartikel

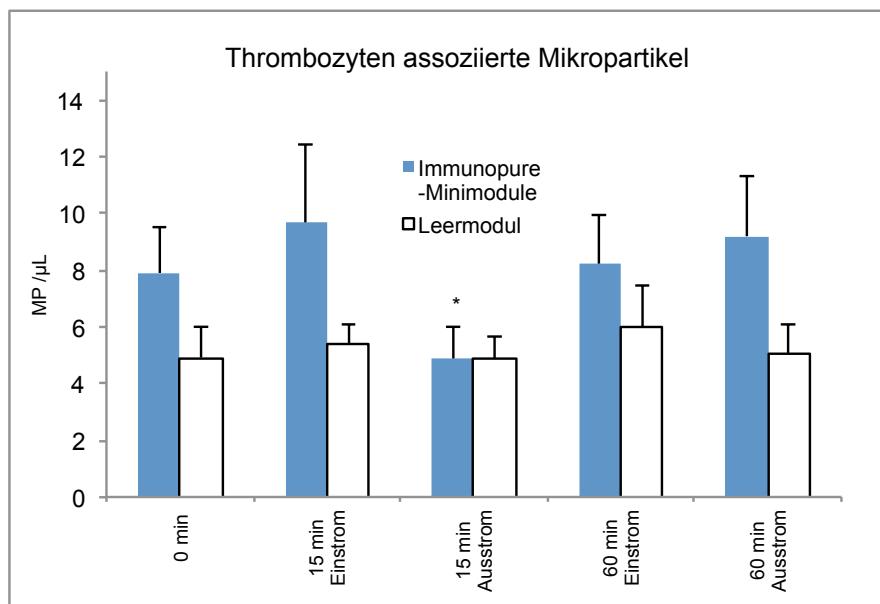


Abb. 11: Anzahl von Thrombozyten assoziierten Mikropartikel während des Rezirkulationsversuches - dargestellt in Zahl / μL - untersucht im Immunopure®-Minimodul und Leermodul. Messungen wurden im Ein- und Ausstrom nach 15 min und 60 min erhoben. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Statistik: untersucht wurden die Ergebnisse im Vergleich mit dem Ausgangswert in Minute 0 mittels Wilcoxon-Test ($n=6$) (* $P<0,05$) und mit den Werten der Leermodulen ($n=6$) mittels U-Test (# $P<0,05$).

Die Anzahl der Mikropartikel war im Einstrom des Minimoduls nach 15 min auf nicht signifikante 133,8% des 0-Wertes gestiegen. Durch die Adsorberpassage konnte eine deutliche und signifikante Reduzierung auf 78,9% des 0-Wertes im Immunopure®-Kreislauf dargestellt werden (gemessen im Ausstrom). Nach 60 min betrugen die Werte vor der Passage durch das Minimodul 133,7% und nach der Passage 145,9% des 0-Wertes. Die Messungen zeigten keine signifikante Veränderung mehr zum 0-Wert. Im Ein- und Ausstrom des Leermoduls variierten die Werte in nicht signifikantem Ausmaß: 129% des 0-Wertes im Einstrom und 106% des 0-Wertes im Ausstrom nach 15 min, sowie nach 60 min 133% des 0-Wertes im Einstrom und 145% des 0-Wertes im Ausstrom.

4.1.1.4 sP-Selektin

In Bezug auf die sP-Selektine konnte im in-vitro-Rezirkulationsversuch keine eliminierende Wirkung im Ein- und Ausstrom des Minimoduls, als auch des Leermoduls festgestellt werden. Es wurde ein signifikanter Anstieg der sP-Selektin Konzentration nach 60min nach Adsorberpassage im Vergleich Einstrom zu Ausstrom festgestellt (28,1ng/ml auf 30,3ng/ml). Es wurde kein Einfluss auf beim Leermodul festgestellt.

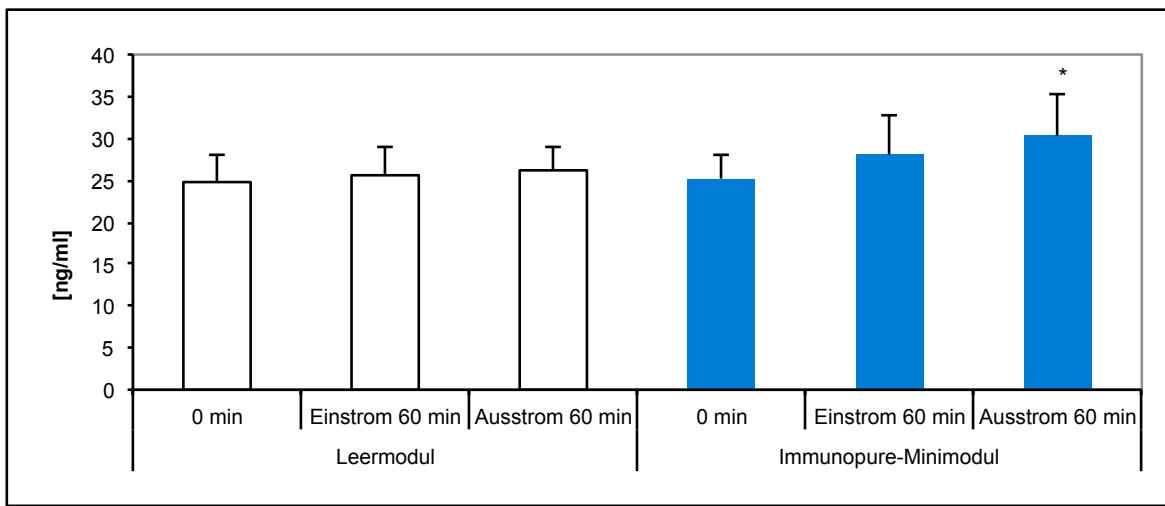


Abb. 12: Wirkung des in vitro-Rezirkulationsversuchs auf die sP-Selektin-Konzentration – gemessen am 0-Wert im Leermodul und Immunopure-Minimodul im Ein- und Ausstrom nach 60min. Es werden Durchschnittswerte und Standartabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 mittels Wilcoxon-Test ($n=6$) ($^*P<0,05$) und mit den Werten der Leermodule ($n=6$) mittels U-Test ($\# P<0,05$).

4.1.1.5 CD40 Ligand

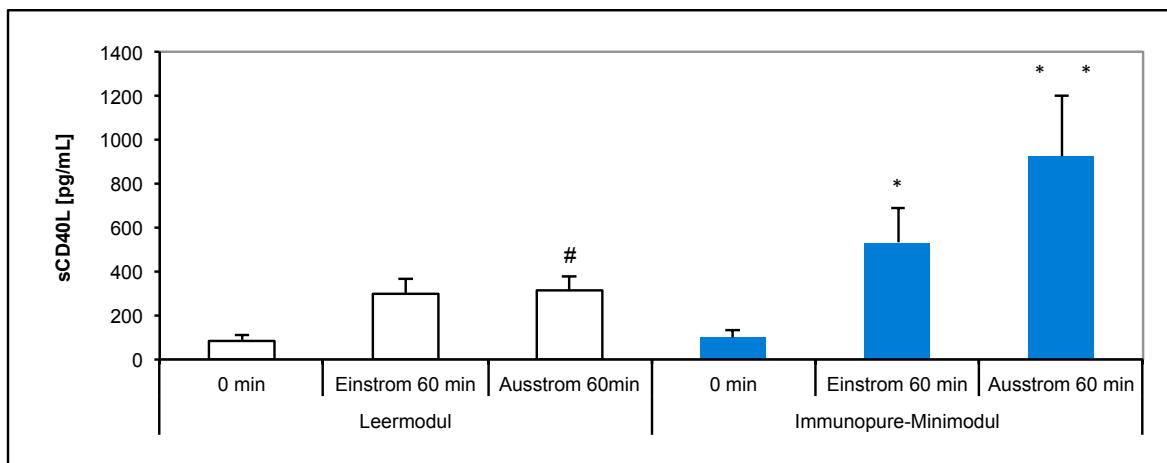


Abb. 13: Konzentration von CD40-Liganden beim in-vitro-Rezirkulationsversuch — gemessen im 0-Wert im Leermodul und Immunopure-Minimodul im Ein- und Ausstrom nach 60min. Es werden Durchschnittswerte und Standartabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test ($n=6$) ($^*P<0,05$) und mit den Werten der Leermodule ($n=6$) mittels U-Test ($\# P<0,05$).

Nach in-vitro-Rezirkulation durch das Immunopure®-Minimodul konnte eine signifikante Erhöhung der CD40L-Konzentration im Vergleich zum 0-Wert in Einstrom und Ausstrom gemessen werden. Der Anstieg der Konzentration zwischen Einstrom und Ausstrom nach 60 min war ebenfalls signifikant. Im Leermodul zeigte sich nach 60 min im Ausstrom ein signifikanter Anstieg im Vergleich zum 0-Wert. Nach Rezirkulation durch das Minimodul zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

4.1.2 Untersuchung der Polyarylat-Resin-Kugeln mit dem konfokalem Rastermikroskop

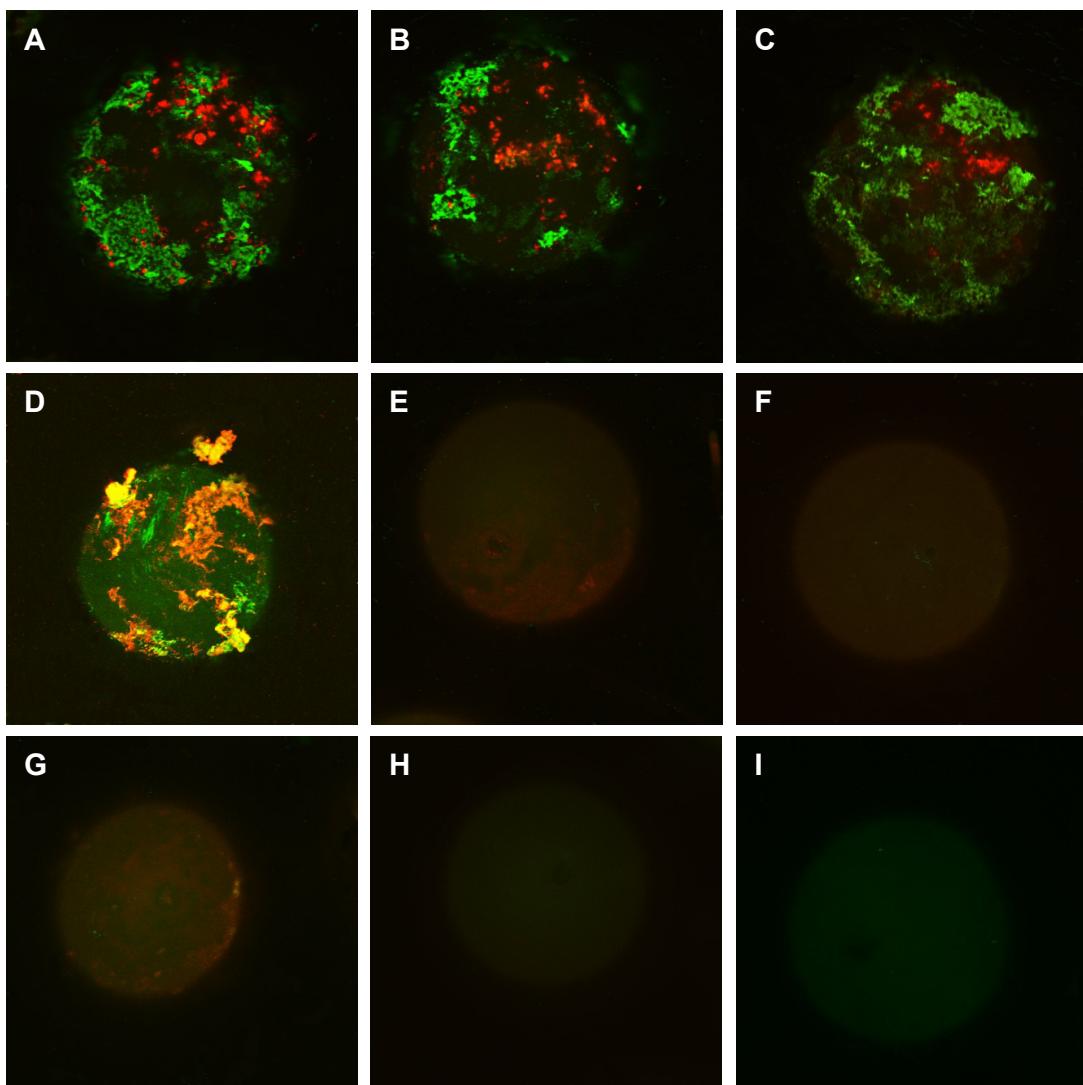


Abb. 14 A-I: Bilder eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes von PAR-Kugeln des Immunopure®-Adsorbers - A-D: nach Blutkontakt in der Zirkulation:
 A: CD42b (grün), CD11b (rot); B: CD42b (grün), CD14 (rot); C: CD42b (rot), CD3 (rot);
 D: Fibrinogen (grün), CD42b (rot); E-H: Kontrollen ohne Blut: E: CD42b (grün), CD11b (rot); F;
 CD42b (grün); CD14 (rot); G: CD42b (rot), CD3 (rot); H: Fibrinogen (grün), CD42b (rot), I: Kontrolle
 ohne primären Antikörper - nach der Blutzirkulation

Um die Zelladsorption an den Polyarylat-Resin-Kugeln (PAR-Kugeln) zu untersuchen, wurden einzelne Kugeln aus den Immunopure®-Minimodulen nach den Rezirkulationsversuchen entnommen und in 3% Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach Immunmarkierung durch primäre und sekundäre Antikörper wurden die Kugeln auf ein Deckglas transferiert und mittels konfokalem Laser-Scanning Mikroskop untersucht. Kugeln ohne Immunmarkierung, sowie ohne Kontakt zu Blut, dienten als Kontrolle. Auf den Bildern A-D (Abb. 38) nach Kontakt mit Blut aus der Immunopure®-Zirkulation:

Hier sind die CD42b-Thrombozyten grün (A und B) bzw. rot (C und D) dargestellt. Auf Bild A sind neben CD42b-Thrombozyten CD11b+-Zellen (auf Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten oder Makrophagen exprimiert) zu sehen. Auf Bild B sind neben CD42b-

Thrombozyten CD14+-Monozyten. Bild C zeigt des Weiteren CD3+-Zellen (bspw. T-Zellen), Bild D Fibrinogen. Letztlich demonstrieren die Bilder des konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes die Adsorption von Fibrinogen, CD42b+ Thrombozyten, CD11b+ tragenden Zellen, CD3+-Leukozyten und CD14+-Monozyten auf der Kugeloberfläche. Auf den Bildern E-H werden Bilder der PAR-Perlen unter dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt, welche nicht mit Blut in Kontakt gekommen sind. Bild I stellt die PAR-Perlen ohne vorherigen Kontakt mit primären Antikörpern dar - nach Kontakt mit der Blutzirkulation.

4.2 In-Vivo - Die Anwendungsbeobachtung

4.2.1 Patientencharakteristika

In die Anwendungsbeobachtung wurden insgesamt sechs Patienten aufgenommen, welche an einer mittel- bis schweren Form der Colitis ulcerosa litten. Das Geschlechterverhältnis betrug 50:50. Die Patienten waren zwischen 27 und 52 Jahren alt bei einem Durchschnittsalter von 40,5 Jahren. Die Frauen waren im Schnitt 38 und die Männer 43 Jahre alt. Vor Beginn der Anwendungsbeobachtung und fünf Wochen nach Therapieende in Woche 10 wurde bei allen Patienten der klinische Aktivitätsindex nach Rachmilewitz (CAI) [78] erhoben.

4.2.2 Therapieansprechen

Alle Patienten konnten alle Apheresebehandlungen und Untersuchungen protokollgemäß absolvieren. Die Apherese wurde von allen Patienten gut vertragen. Relevante Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Fünf der sechs Patienten profitierten von der Behandlung (83%), vier von sechs (67%) gingen sogar in Remission. Die Remission ist definiert als ein Score-Wert vier Punkten oder weniger - das klinische Ansprechen als Verringerung des Scores von mindestens drei Punkten. Am stärksten profitierte eine 27jährige Patientin mit einer Verringerung des CAI um neun Punkte. Im Durchschnitt reduzierte sich der CAI der Patienten, sofern diese auf die Therapie ansprachen, um 6,4 Punkte.

Tab. 12: Vorstellung der Patientencharakteristika, der bisherigen medizinischen Therapie sowie des CAI nach Rachmilewitz vor Therapie, sowie fünf Wochen nach Therapieende

Patient	Geschlecht	Alter	med. Therapie	CAI vorher	CAI danach	Verbesserung
1	Männlich	52	5-ASA, Glukokortikoide, Tacrolimus	6	1	5
2	Weiblich	27	Tacrolimus, 5-ASA	13	4	9
3	Männlich	30	5-ASA, Glukokortikoide	7	3	4
4	Weiblich	35	5-ASA	13	5	8
5	Männlich	47	5-ASA, Glukokortikoide, Tacrolimus	10	10	0
6	Weiblich	52	5-ASA, Glukokortikoide	8	2	6

4.2.3 Wirkung der Apherese

4.2.3.1 Vitalparameter

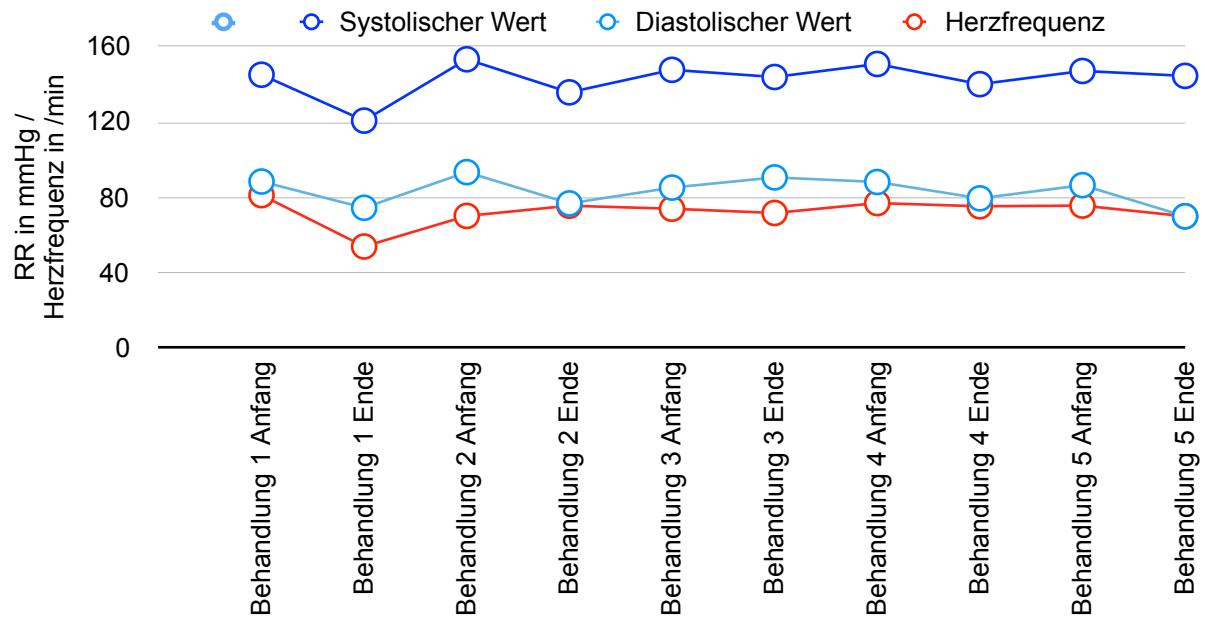


Abb: 15: Mittelwerte der Vitalparameter der Patienten am Anfang und Ende jeder Behandlung

Vor allem zu Beginn der Anwendungsbeobachtung waren Blutdruck und Herzfrequenz zu Beginn einer Apheresesitzung höher als am Ende derselben. Diese Differenz wurde in den folgenden Apheresesitzungen jedoch geringer (Vergleich Mittelwert 145/88 mmHg zu Beginn der Apherese zu 120/75 mmHg zum Ende der Apheresesitzung 1, sowie 147/80 mmHg zu 144/70 mmHg in Apheresesitzung 5). Nach Einschätzung des betreuenden Arztes waren dies keine klinisch relevanten Veränderungen.

4.2.3.2 Blutbild

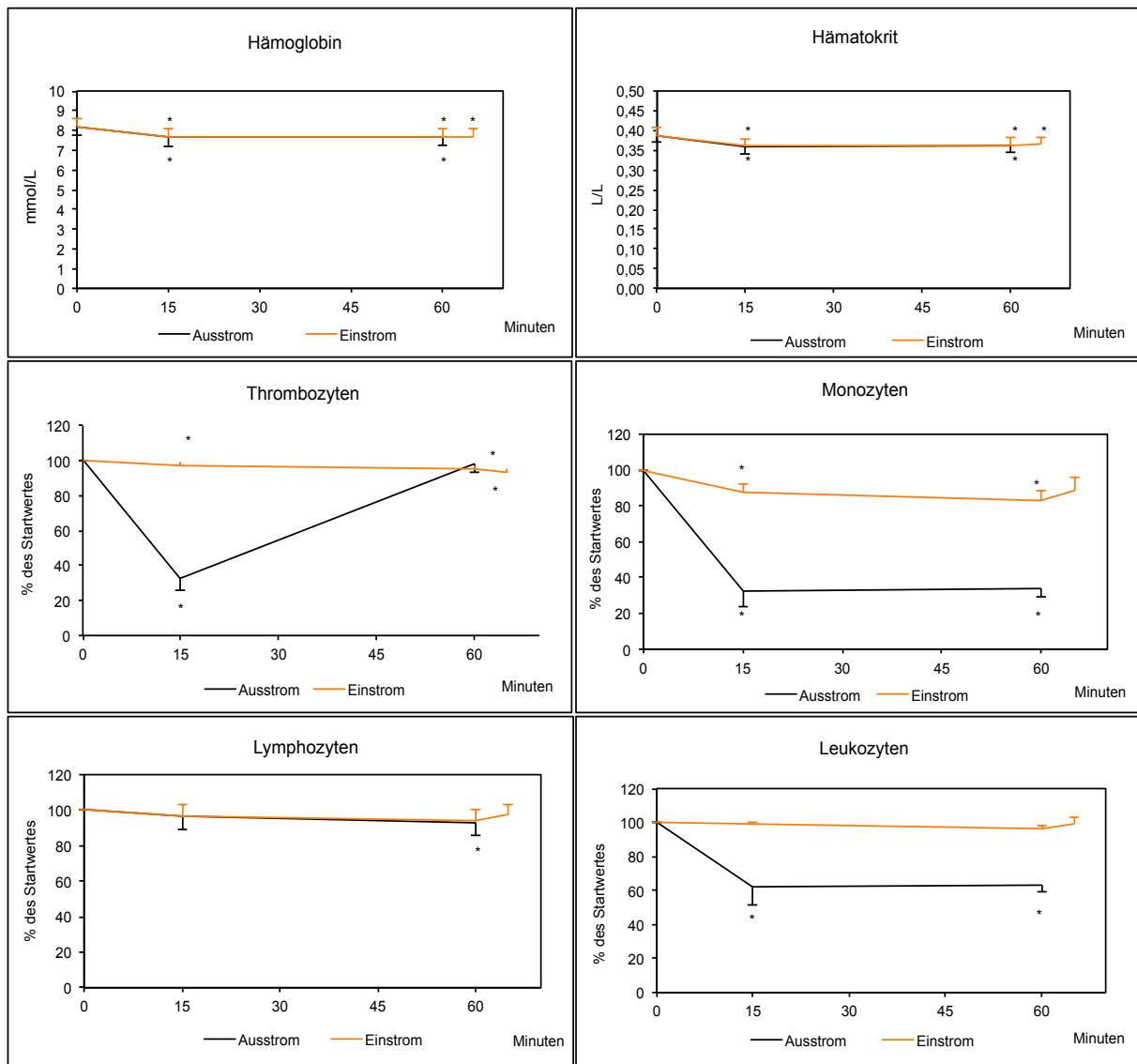


Abb. 16 A-F: Veränderungen des Blutbildes (Hämoglobin (A), Hämatokrit (B), Thrombozyten (C), Monozyten (D), Lymphozyten (E), Leukozyten (F)) im Ein- und Ausstrom nach 15 min und 60 min im Rahmen der Apherese mit dem Immunopure®-Adsorber. Es werden Durchschnittswerte und Standartabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test (n=6) (*P<0,05)

Im Rahmen der Anwendungsbeobachtung konnten sowohl beim Hämoglobin-Wert als auch beim Hämatokrit zwar nur geringfügige, aber signifikante Reduzierungen festgestellt werden. Der Hämoglobin-Wert sank signifikant nach 15 min von 8,2mmol/l auf 7,6mmol/l im Ein- und Ausstrom. Während der weiteren Apherese blieb der Hämoglobin-Wert bei konstant 7,6mmol/l. Der Hämatokrit sank signifikant von 0,39 L/L auf 0,36 L/L im Ein- und Ausstrom nach 15 min und verblieb auf diesem Wert. Die Anzahl der Thrombozyten wurde im Verlauf der Apheresetherapie signifikant reduziert auf 97,14% des 0-Wertes im Einstrom nach 15 min und konnte durch Adsorberpassage auf signifikante 32,5% des 0-Wertes reduziert werden. Nach 60 min waren 95% des 0-Wertes im Einstrom zu erheben (signifikante Reduzierung). Nach Passage konnte eine Reduzierung der Thrombozyten auf 93,1% des 0-Wertes erhoben werden (signifikante Reduzierung im Vgl. zum 0-Wert).

Die Monozytenanzahl wurde durch die Apherese signifikant auf 87,9% des 0-Wertes nach 15 min im Einstrom und ebenso signifikant auf 32,5% nach 15 min im Ausstrom reduziert. Nach 60 min Apherese konnte im Einstrom 82,3% und im Ausstrom 34,1% des 0-Wertes nachgewiesen werden (signifikante Reduzierungen). Bei der Messung der Lymphozytenzahlen zeigte sich lediglich im Ausstrom nach 60min eine signifikante Reduzierung auf 92,5% des 0-Wertes. Die Messungen nach 15 min im Ein- und Ausstrom (97,1% und 96,2% des 0-Wertes), sowie nach 60 min im Einstrom (94,1% des 0-Wertes) stellten nicht signifikante Reduzierungen dar. Die Anzahl der Leukozyten reduzierte sich nur nach Adsorberpassage im Ausstrom signifikant: nach 15 min auf 61,8% des 0-Wertes und nach 60 min 62,76% des 0-Wertes. Die Messungen im Einstrom zeigten mit 98,9% des 0-Wertes nach 15 min und 96,4% des 0-Wertes nach 60min keine signifikante Reduzierungen.

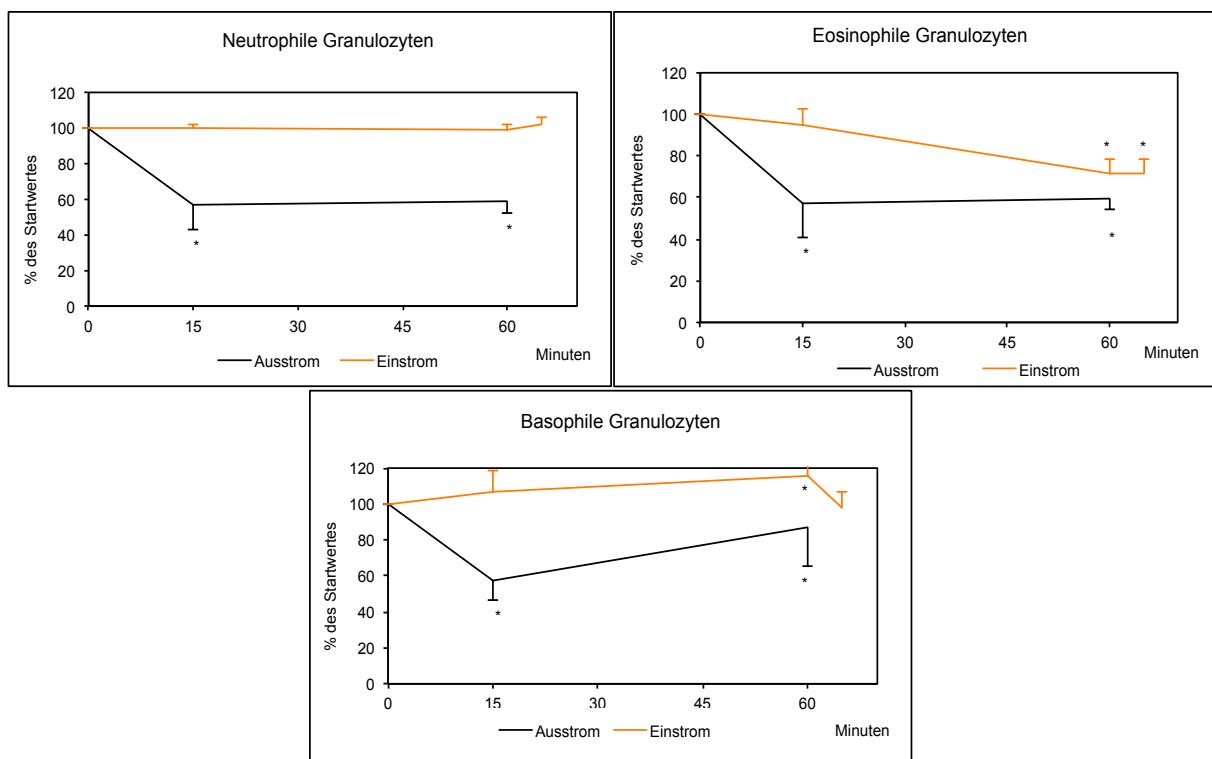


Abb. 16 G-I: Veränderungen des Blutbildes (Neutrophile Granulozyten (G), Eosinophile Granulocyten (H), Basophile Granulozyten (I)) - im Ein- und Ausstrom nach 15 min und 60 min im Rahmen der Apherese mit dem Immunopure®-Adsorber. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test (n=6)(*P<0,05)

Die neutrophilen Granulozyten konnten durch die Adsorberpassage signifikant gesenkt werden: So betrug die Zahl der neutrophilen Granulozyten nach Adsorberpassage im Ausstrom nach 15 min 56,6% des 0-Wertes (im Vergleich zu nicht signifikante 100,22% des 0-Wertes im Einstrom) und nach 60min 58,6% des 0-Wertes (Vgl: nicht signifikante 95,3% des 0-Wertes im Einstrom). Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten sank nach Adsorberpassage nah 15 min auf 57,2% des 0-Wertes im Ausstrom. Im Einstrom wurde eine nicht signifikante Reduzierung auf 95,3% des 0-Wertes erhoben. Nach 60 min

zeigten sowohl die Messungen im Ein- als auch Ausstrom signifikante Reduzierungen. Im Einstrom wurden 71,5% des 0-Wertes, im Ausstrom 59,8% des 0-Wertes erhoben.

Die basophilen Granulozyten konnten durch die Apherese ebenfalls reduziert werden.

Nach 15 min wurde die Zahl auf 57,1% des 0-Wertes im Ausstrom reduziert.

Vor Adsorberpassage stieg die Zellzahl nicht signifikant auf 106,62% des 0-Wertes an.

Nach 60 min konnte die Apherese die Zellmenge ebenfalls signifikant reduzieren: von einem signifikanten Anstieg von 115,3% im Einstrom auf 86,6% im Ausstrom.

4.2.3.3 Veränderungen des Blutbildes über fünf Wochen

Bei der Untersuchung des Blutbildes über fünf Wochen konnte keine signifikante Veränderung einzelner Zellpopulationen erhoben werden. Die Verläufe der einzelnen Zellen sind in Tab 14. graphisch dargestellt:

Tab. 13: Veränderungen einzelner Zellsorten über fünf Wochen. Es werden Durchschnittswerte und Standartabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Statistisch verglichen wurden die Ergebnisse mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test (n=6)(*P<0,05)

	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Hämoglobin (mmol/l)	8,27	8,20	8,20	8,15	8,17
Hämatokrit (l/l)	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
Thrombozyten ($10^9/L$)	311,67	288,00	322,17	325,83	309,17
Leukozyten ($10^9/L$)	10,42	10,35	9,87	9,94	8,95
Lymphozyten ($10^9/L$)	13,02	14,42	15,63	16,28	15,00
Monozyten ($10^9/L$)	6,64	7,00	6,82	5,98	7,03
Neutrophile Granulozyten ($10^9/L$)	77,26	76,02	74,62	74,72	75,03
Eosinophile Granulozyten ($10^9/L$)	2,72	2,22	2,50	2,58	2,40
Basophile Granulozyten ($10^9/L$)	0,40	0,35	0,40	0,45	0,60

4.2.3.4 Anzahl der Oberflächenmarker

Die Wirkung der Apherese mittels Immunopure® auf verschiedene Zellen wurde wie in den *in vitro*-Versuchen auch *in vivo* untersucht:

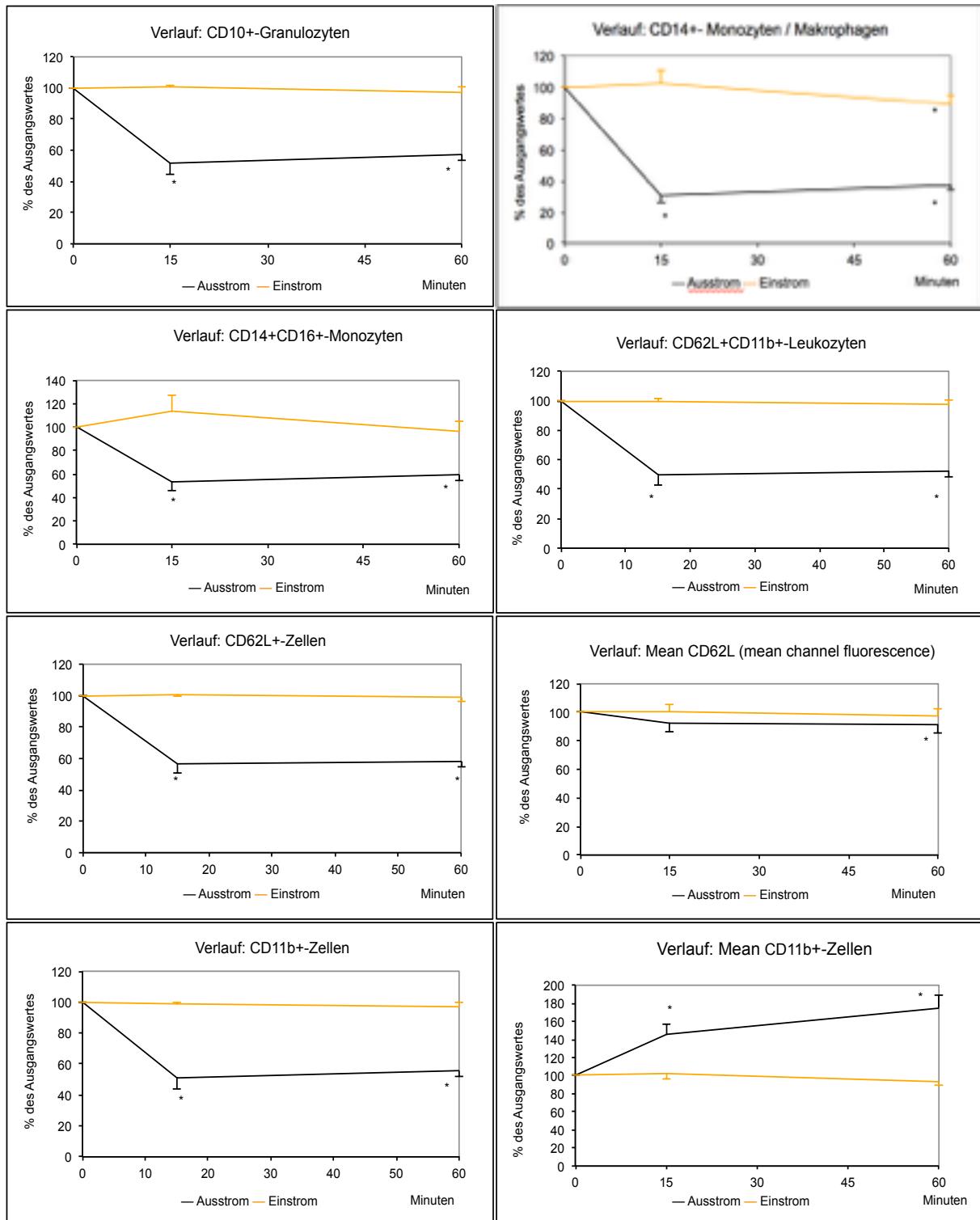


Abb. 17 A-H: CD10+-Granulozyten (A), CD14+-Monozyten / Makrophagen (B), CD14+CD16+- Monozyten (C), CD62L+CD11b+-Leukozyten (D), CD62L+-Zellen (E), Mean-CD62L-Zellen (F), CD11b+-Zellen (G) und MeanCD11b-Zellen (H) - gemessen in Ein- und Ausstrom nach 15 und 60 min im Minimodul und Leermodul. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test (n=6) (*P<0,05) und mit den Werten der Leermodule (n=6) mittels U-Test (# P<0,05).

Durch die Apherese konnte die Anzahl CD10+-Granulozyten im Ausstrom signifikant nach 15 min auf 51,7% des 0-Wertes (Vgl.: 100,4% im Einstrom) und nach 60 min auf 57,8% des 0-Wertes (Vgl.: 97,2% im Einstrom) reduziert werden. Die Messergebnisse im Einstrom zeigten keine signifikanten Unterschiede. Bei Messung der CD14+-Monozyten konnten im Ausstrom nach 15 min (30,7% des 0-Wertes) und 60 min (37,4% des 0-Wertes) signifikante Reduzierungen erhoben werden. Signifikant war auch die gemessene Veränderung im Einstrom nach 60 min bei 89,2% des 0-Wertes - Die Messung im Einstrom nach 15 min (102,4% des 0-Wertes) zeigte hingegen keine signifikante Reduzierung. CD14+CD16+-Monozyten konnten durch die Adsorberpassage signifikant reduziert werden. Die Messungen im Ausstrom zeigten eine signifikante Reduktion nach 15 min auf 52,9% und nach 60 min 59,5% des 0-Wertes. Die Messungen im Einstrom nach 15 min (113,4% des 0-Wertes) und nach 60 min (95,9% des 0-Wertes) waren nicht signifikant verändert. CD62L+CD11b+-Leukozyten konnten ebenfalls durch die Adsorberpassage signifikant reduziert werden. Nach 15 min wurden auf 49,8% des 0-Wertes im Ausstrom (signifikant - Vgl. 99,8% im Einstrom) und nach 60 min signifikante 52,3% des 0-Wertes (signifikant - Vgl. 97,4% im Einstrom) gemessen. Die Messungen im Einstrom zeigten keine signifikanten Veränderungen. Bei Untersuchung der Apherese-wirkung auf CD62L+-Zellen zeigte sich eine signifikante Reduzierung im Ausstrom auf 56,6% des 0-Wertes nach 15 min (Vgl. 100,8% im Einstrom) und 57,7% des 0-Wertes nach 60 min (Vgl. 99% im Einstrom). Im Einstrom waren die Veränderungen nicht signifikant: Bei der Untersuchung Mean CD62L+-Zellen zeigte sich ein nur geringer Effekt: Lediglich im Ausstrom nach 60min konnte eine signifikante Reduzierung auf 91% des 0-Wertes dargestellt werden. Die Messungen im Einstrom (100,1% des 0-Wertes nach 15 min und 97,1% nach 60 min), sowie nach 15 min im Ausstrom (92,7% des 0-Wertes) ergaben keine signifikanten Reduzierungen. CD11b+-Zellen wurden durch die Apherese nach 15 min auf 98,9% des 0-Wertes im Einstrom (nicht signifikant) und 50,7% des 0-Wertes im Ausstrom (signifikant) reduziert. Nach 60 min betrug die Reduktion 96,7% des 0-Wertes im Einstrom (nicht signifikant) und 55,7% des 0-Wertes im Ausstrom (signifikant). Die Anzahl Mean CD11b+-tragender Zellen stieg durch die Passage des Adsorbermoleküls. So betrug die Anzahl der CD11b+-tragenden Zellen im Einstrom nach 15 min 103% des 0-Wertes (signifikant) und nach 60 min 93,3% des 0-Wertes (signifikant) — im Ausstrom stieg die Zahl der Zellen auf 145,7% nach 15 min und 175,2% nach 60 min an. Die Messungen im Ausstrom ergaben im Vergleich zum 0-Wert signifikant erhöhte Werte.

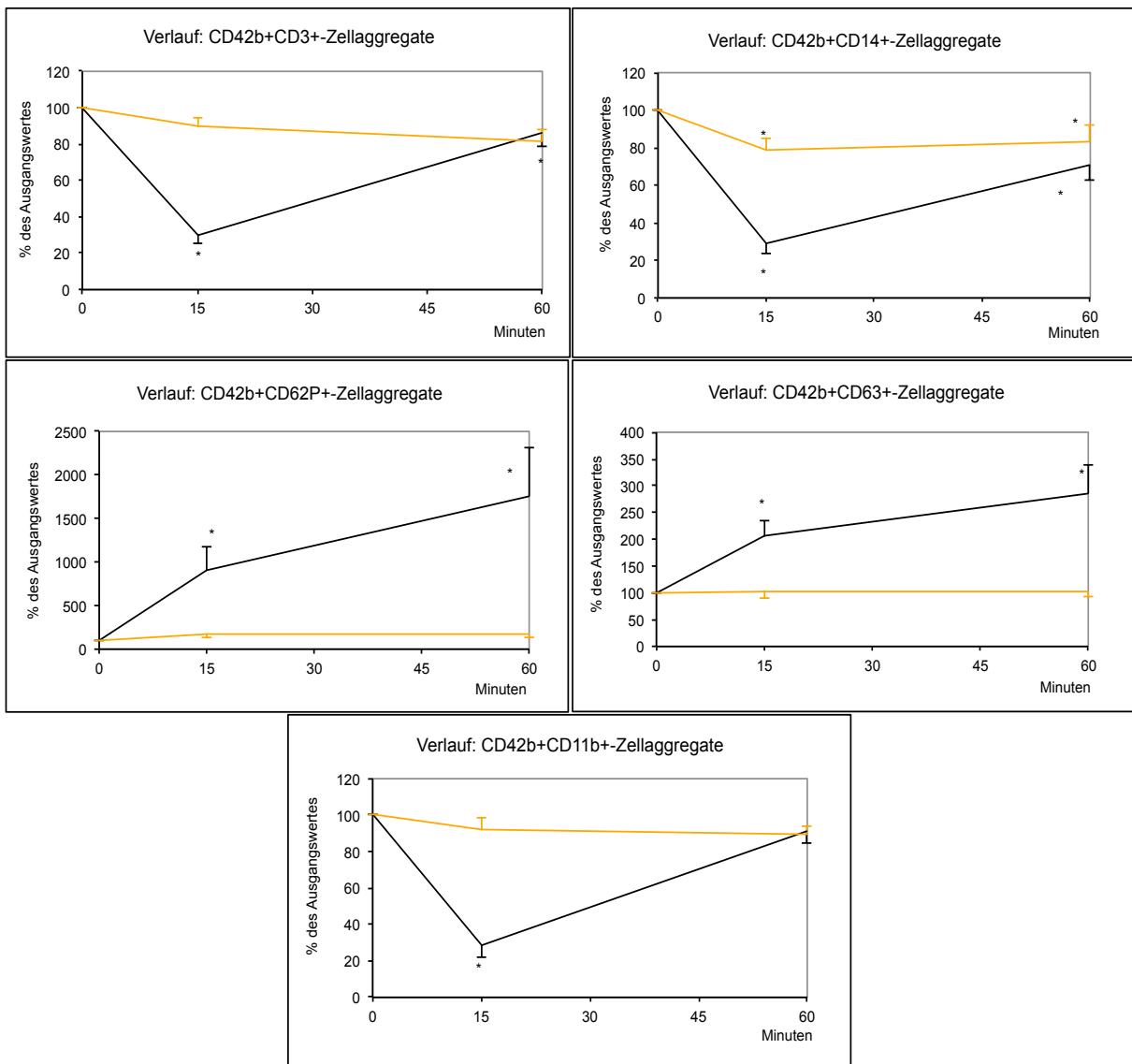


Abb. 17 I-M : Durchflusszytometrie-Analysen von CD42b+CD11b+- (I), CD42b+CD3+- (J), CD42b+CD14+- (K), CD42b+CD62P+- (L), CD42b+CD63+-Zellaggregaten (M) - gemessen in Ein- und Ausstrom nach 15 und 60 min im Minimodul und Leermodul. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test (n=6) (*P<0,05) und mit den Werten der Leermodule (n=6) mittels U-Test (# P<0,05).

Bei der Untersuchung der CD42b+CD3+-Zellaggregat konnten im Ausstrom nach 15 min (29,9% des 0-Wertes) und Einstrom nach 60 min (81,5% des 0-Wertes) signifikante Reduzierungen erhoben werden. Die Messergebnisse im Einstrom nach 15 min (90,2% des 0-Wertes) und im Ausstrom nach 60 min (85,9% des 0-Wertes) erbrachten keine signifikanten Veränderungen. Die Messergebnisse der CD42b+CD14+-Zellaggregat zeigten sowohl nach 15 min im Einstrom (78,6% des 0-Wertes), als auch im Ausstrom (29% des 0-Wertes) eine signifikante Wirkung der Apherese. Nach 60 min konnten ebenfalls signifikante Reduzierungen im Einstrom (83,5% des 0-Wertes) als auch im Ausstrom (71% des 0-Wertes) erhoben werden.

Die gemessene Anzahl der Thrombozyten mit den Zellaggregaten CD42b+CD62P+- als auch CD42b+CD63+ stieg durch die Adsorberpassage signifikant. Bei den CD42b

+CD62P+-Zellaggregaten zeigte sich nach Passage des Absorbers nach 15min ein signifikanter Anstieg von 102,5% des 0-Wertes im Einstrom auf 207,5% im Ausstrom. Nach 60min konnte ein signifikanter Anstieg von 170,3% des 0-Wertes im Einstrom auf 1753% im Ausstrom detektiert werden. Die Zahl CD42b+CD63+-Zellaggregate stieg durch die Adsorberpassage nach 15 min und 60 min signifikant. Im Einstrom zeigten sich nach 15 min 102,5% des 0-Wertes (nicht signifikant), im Ausstrom 207,5% des 0-Wertes (signifikant). Nach 60 min konnte ein Anstieg der Zellaggregate von 102,5% des 0-Wertes (nicht signifikant) auf 285,2% des 0-Wertes (signifikant) im Ausstrom dargestellt werden. Bei der Untersuchung der CD42b+-CD11b+-Zellaggregate zeigte sich nur im Ausstrom nach 15 min eine signifikante Reduzierung auf 28,6% des 0-Wertes. Die Messungen im Einstrom nach 15 min (92,3% des 0-Wertes), als auch die Messungen nach 60 min (89,5% des 0-Wertes im Einstrom und 91,5% im Ausstrom) zeigten keine signifikanten Reduzierungen.

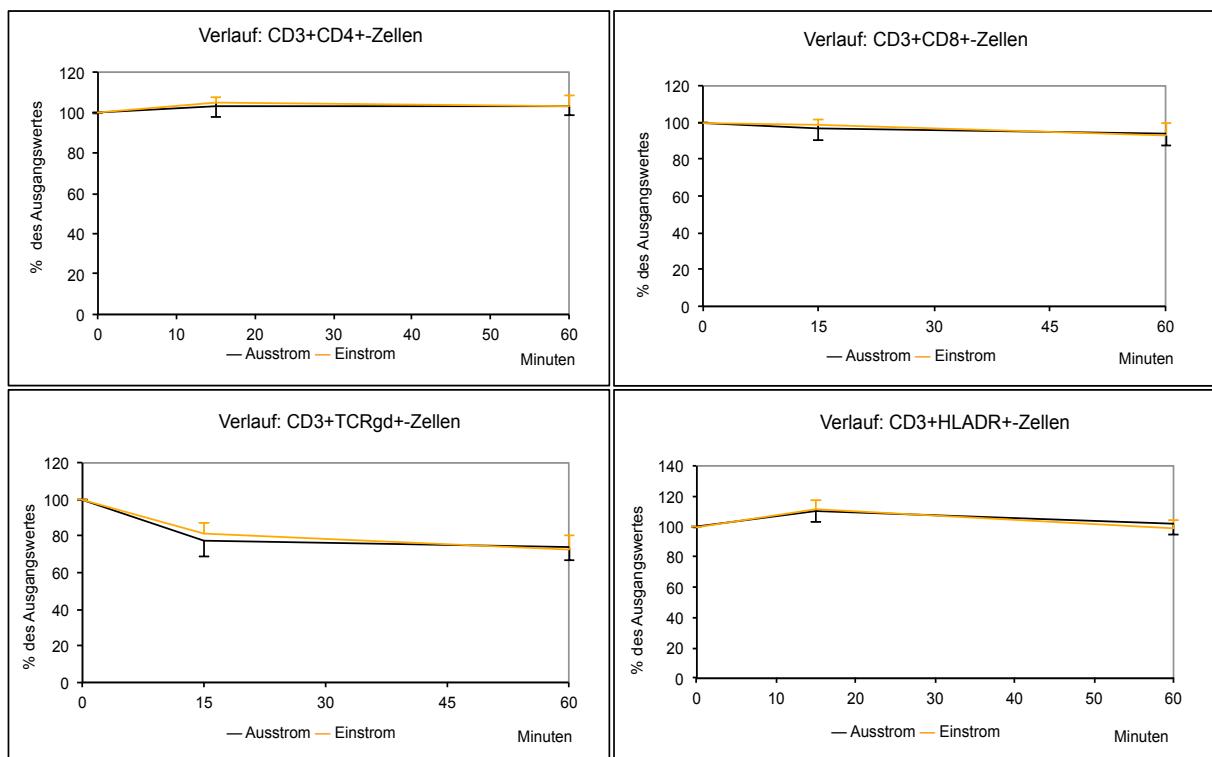


Abb. 17 N-Q: Durchflusszytometrie-Analysen von CD3+CD4+- (N), CD3+CD8+- (O), CD3+TCRgd+- (P), CD3+HLADR-Zellen (Q) - gemessen in Ein- und Ausstrom nach 15 und 60 min im Minimodul und Leermodul. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test (n=6)(*P<0,05) und mit den Werten der Leermodule (n=6) mittels U-62Test (# P<0,05).

Es konnte kein signifikanter Einfluss der Aphrese auf CD3+CD4+-, CD3+CD8+-, CD3+TCRgd+- und CD3+HLADR+-Zellaggregate festgestellt werden. Die Zahl CD3+CD4+-Zellaggregate betrug nach 15 min im Einstrom 105,1% des 0-Wertes (nicht signifikant) und im Ausstrom 103,2% des 0-Wertes (nicht signifikant). Nach 60 min wuchs die Anzahl der Zellen leicht von 102,9 des 0-Wertes im Einstrom (nicht signifikant) auf

103,3% des 0-Wertes im Ausstrom (nicht signifikant). Die Zahl CD3+CD8+-Zellaggregate betrug nach 15 min im Einstrom 98,4% des 0-Wertes (nicht signifikant) und im Ausstrom 97,2% (nicht signifikant); nach 60 min im Einstrom 93,0 % des 0-Wertes (nicht signifikant) und im Ausstrom 94,0 % des 0-Wertes (nicht signifikant). CD3+TCRgd+-Zellaggregate wurden nach 15 min auf 81,0% des 0-Wertes im Einstrom (nicht signifikant) und 77,7% des 0-Wertes im Ausstrom (nicht signifikant) signifikant reduziert. Nach 60 min betrug die Zahl der Zellaggregate 72,3 % im Einstrom (nicht signifikant) und 74,0 % im Ausstrom (nicht signifikant). Die Zahl der CD3+HLADR+-Zellaggregate betrug nach 15 min im Einstrom 111,0% des 0-Wertes (nicht signifikant) und im Ausstrom 110,5% (nicht signifikant). Nach 60 min wurden 98,9% im Einstrom (nicht signifikant) und 101,5% im Ausstrom (nicht signifikant) gemessen.

4.2.4 Wirkung auf Mikropartikel

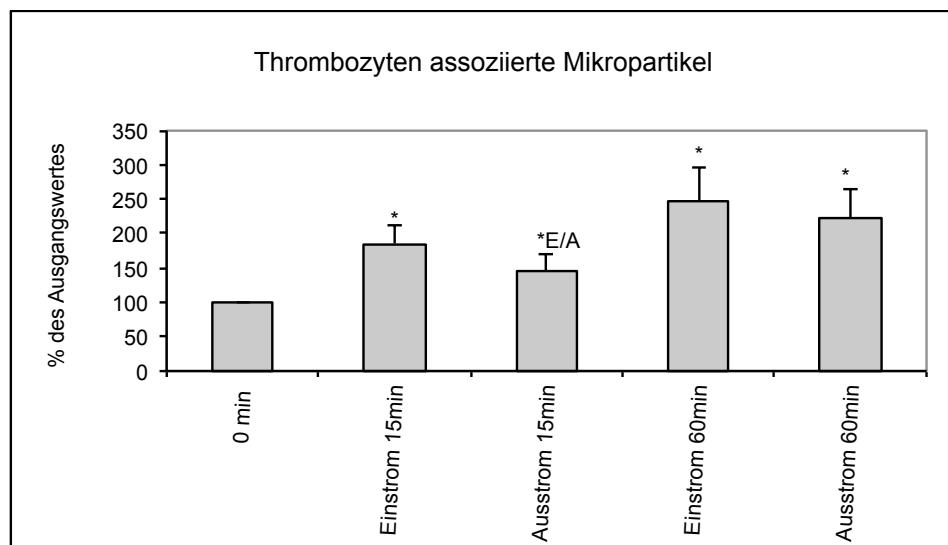


Abb. 18: Wirkung der Apherese auf Thrombozyten assoziierte Mikropartikel - gemessen im 0-Wert, sowie im Ein- und Ausstrom nach 15min und 60min. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Verglichen wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test (n=6)(*P<0,05)

Die Anzahl der Thrombozyten-assoziierten Mikropartikel im Einstrom stieg nach 15 min auf signifikante 185,7% des 0-Wertes an. Durch die Adsorberpassage wurde die Zahl der Mikropartikel signifikant zum Vorwert auf 146,4% des 0-Wertes reduziert (*E/A). Nach 60 min wurden im Ein- und Ausstrom im Vergleich zum 0-Wert signifikant mehr Mikropartikel gemessen (247,8% im Einstrom und 223,4% im Ausstrom). Die Passage durch den Immunopure®-Adsorber konnte die Mikropartikel zwar reduzieren - der Unterschied zwischen der Anzahl im Einstrom und Ausstrom war jedoch nicht signifikant.

4.2.5 Wirkung auf sP-Selektin

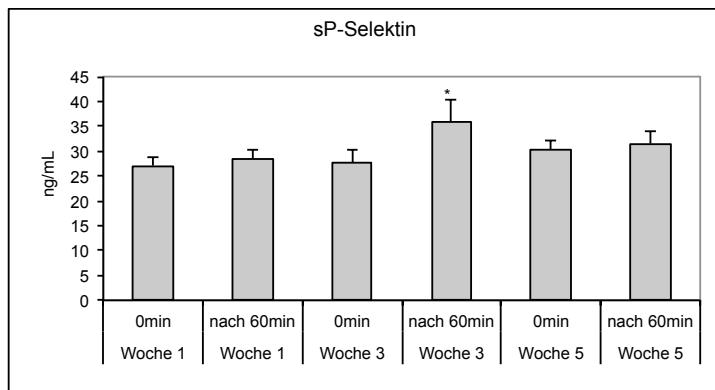


Abb. 19: Wirkung der Apherese auf die sP-Selektinkonzentration im Plasma im Rahmen der Behandlung mit Immunopure® - gemessen im 0-Wert sowie nach 60min in der 1., 3. und 5. Woche. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Verglichen wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert mittels Wilcoxon-Test (n=6)(*P<0,05)

Auf die sP-Selektin-Konzentration im Plasma konnte die Apheresetherapie keine eliminierende Wirkung ausüben. In der dritten Woche stieg die Konzentration der sP-Selektine im Vergleich zum Startwert der Woche sogar signifikant an: von 27,6 ng/ml auf 35,8 ng/ml.

4.2.6 Wirkung auf CD40-Ligand

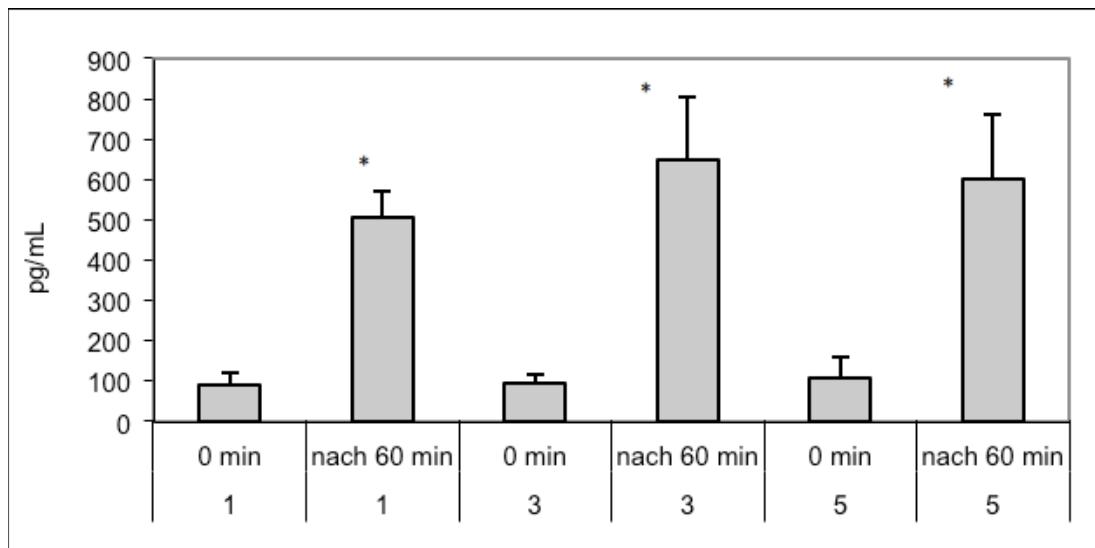


Abb. 20: Wirkung der Apherese auf die CD40-Liganden-Konzentration in der ersten, dritten und fünften Woche der Behandlung mit Immunopure® - gemessen im 0-Wert sowie nach 60min. Es werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Untersucht wurden die Ergebnisse im Verlauf mit dem Ausgangswert mittels Wilcoxon-Test (n=6) (*P<0,05)

Die CD40-Liganden-Konzentration stieg im Verlauf der Apherese bei den Messungen in der ersten, der dritten und der fünften Woche nach 60min im Vergleich zum 0-Wert

signifikant an. So stieg die Konzentration in Woche eins von 88,13 pg/ml auf 507,8 pg/ml an. In Woche drei war ein Anstieg von 93,4 pg/ml auf 648,2 pg/ml, in Woche fünf von 108,8 pg/ml auf 602,62 pg/ml zu verzeichnen. Die Messergebnisse nach 60 min waren signifikant verändert im Vergleich zum 0-Wert der jeweiligen Woche.

4.2.7 Technische Durchführbarkeit

Die technische Durchführbarkeit der Anwendungsbeobachtung betrug 100%. Alle Behandlungen konnten protokollgemäß ohne Zwischenfälle beendet werden.

4.2.8 Evaluierung der Anwendungsbeobachtung

Alle sechs Patienten beteiligten sich an einer schriftlichen Evaluation und sendeten einen Fragebogen ca. anderthalb bis zwei Jahre nach Ende der Anwendungsbeobachtung ausgefüllt zurück. Alle Patienten beschrieben ihren Gesundheitszustand nach der AWB im Vergleich zum Zustand vor der AWB als subjektiv „verbessert“ - sogar Patient 5, dessen CAI vor und nach Studienteilnahme unverändert zehn Punkte betrug. Zwei Patienten bezeichneten ihn als „wesentlich verbessert“, drei als „verbessert“ und ein Patient als „leicht verbessert“. Keiner der Patienten beschrieb den Gesundheitszustand als „nicht verändert“, „geringfügig schlechter“ oder „wesentlich schlechter“. Alle Patienten profitierten subjektiv von der Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung. Zwei Patienten empfanden den Ertrag der Therapie im Vergleich zum Therapieaufwand als sehr lohnenswert, drei als lohnenswert und eine Person als gering lohnenswert.

Die Auswahloptionen „neutral“, „nicht lohnenswert“ oder „eine Zumutung“ wählte kein Patient. Sofern die Remission gemäß des klinischen Aktivitätsindex nach Rachmilewitz erreicht wurde, hielt diese im Schnitt fünfeinhalb Monate, wobei die längste Remissionsdauer zehn Monate und die kürzeste zweieinhalb Monate betrug.

Der Median betrug sechs Monate. Vier der sechs Patienten würden wieder an einer Apheresetherapie teilnehmen und dabei einen Rhythmus von 3-4x / Monat oder 5-10x / Jahr akzeptieren. Für die zwei übrigen Patienten ist die Apherese aufgrund einer Kolektomie keine Option mehr.

Tab. 14: Subjektiver Zustand der Patienten im Vergleich vor- und nach Apherese

	Wesentlich verbessert	Verbessert	Leicht verbessert	keine Veränderung	geringfügig verschlechtert	wesentlich verschlechtert
Zustand vor der ersten / nach der letzten AWB	2 Pat.	3 Pat.	1 Pat.	0 Pat.	0 Pat.	0 Pat.
Zustand 1 Jahr nach der letzten AWB - im Vgl. zur Zeit vor AWB	2 Pat.	1 Pat.	0 Pat.	1 Pat.	1 Pat.	0 Pat.
Sonstiges	1 Pat. (Z.n. Operation)					

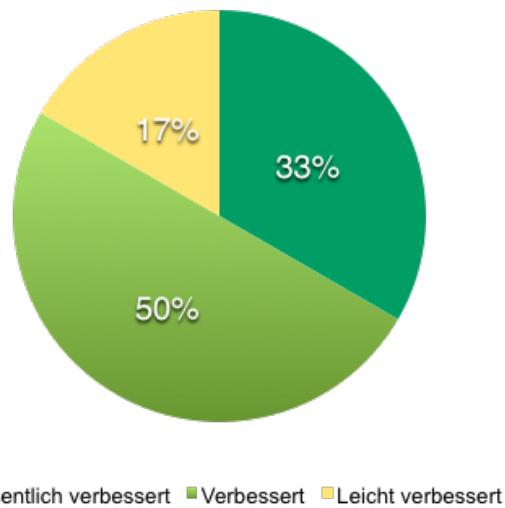


Abb. 21: Wie erging es Ihnen nach der AWB-Teilnahme im Vergleich zum vorherigen Befinden? Antwortmöglichkeiten: „wesentlich verbessert“, „besser“, „leicht verbessert“, „keine Veränderung“, „geringfügig schlechter“ oder „wesentlich schlechter“

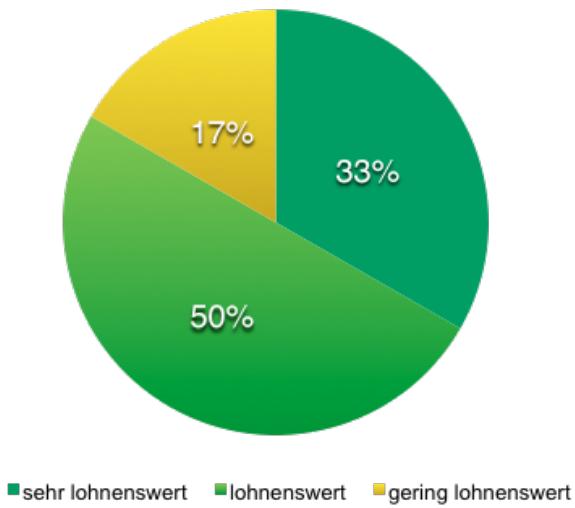


Abb. 22: Als wie lohnenswert empfanden Sie das Ergebnis der Therapie im Angesicht des erforderlichen Aufwandes wie Anfahrt, Punktion, zeitlicher Aufwand? Antwortmöglichkeiten: „sehr lohnenswert“, „lohnenswert“, „gering lohnenswert“, „neutral“, „nicht lohnenswert“ oder „Zumutung“.

4.3 Die Kasuistiken

Aufgrund der geringen Zahl an Probanden lohnt es sich, die Patientenhistorien detaillierter anzuschauen, um so möglicherweise neue Erkenntnisse zu generieren. Die Probanden stammen aus Mecklenburg-Vorpommern und haben auf eine bisherige konventionelle Therapie nicht angesprochen, waren nicht mehr sensibel bzw. wiesen Kontraindikationen für eine solche auf. Aufgrund der individuell sehr unterschiedlichen Krankheits- und Therapieverläufe stellten die Patienten ein sehr heterogenes Kollektiv dar.

4.3.1 Patient 1

Der 51jährige männliche Patient litt neun Jahre nach Erstdiagnose zum Zeitpunkt der AWB an einer Pankolitis. Er war mit 5-ASA, Glukokortikoiden und Tacrolimus eingestellt. Der Patient beschrieb seine Beschwerden als dauerhaft. Die medikamentöse Therapie erbrachte dabei nur einen mäßigen Erfolg. Etwa drei Wochen nach der Apherese war der Patient das erste Mal seit acht Jahren beschwerdefrei. Der CAI sank von sechs auf einen Punkt und die Verbesserung hielt ca. 75 Tage an. Auch den Aufwand empfand der Patient als „lohnenswert“. Die Anzahl der Thrombozyten konnte effektiv nach 15 min im Ausstrom auf 17,2% des 0-Wertes reduziert werden. Am Ende der Apherese betrug die Thrombozytenanzahl 101,3% des 0-Wertes.

Tab. 15: Patient 1: Mittelwerte von Zellverläufen von Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil und eosinophil), Monozyten - Hk-Korrigiert

	0-Wert	Einstrom 15 min	Ausstrom 15 min	Einstrom 60 min	Ausstrom 60 min	Ende
Thrombozyten	100 %	106,26 %	17,2 %	102,04 %	108,15 %	101,03 %
Leukozyten	100 %	99,11 %	44,36 %	96,45 %	65,72 %	102,93 %
Neutrophile Granulozyten	100 %	97,86 %	36,17 %	97,27 %	62,35 %	105,09 %
Eosinophile Granulozyten	100 %	94,24 %	27,24 %	78,16 %	62,82 %	81,91 %
Monozyten	100 %	95,76 %	22,07 %	102,38 %	43,93 %	107,9 %

4.3.2 Patient 2

Die Patientin war 26 Jahre alt und zum Zeitpunkt der Anwendungsbeobachtung seit 16 Jahren an Colitis ulcerosa erkrankt. Sie litt an einer Pankolitis und war mit Tacrolimus und 5-ASA eingestellt. Die Patientin empfand die Therapie als „lohnenswert“ und beschrieb ihr Befinden nach der Apherese als „verbessert“. Der CAI verbesserte sich um neun Punkte von 13 auf vier Punkte. Damit war sie die Patientin, deren CAI sich am stärksten verbesserte. Auffällig war die überdurchschnittliche effektive Reduzierung der Thrombozytenanzahl. So reduzierte sich die Zahl der Thrombozyten durch die Apherese nach 15 min im Ausstrom im Durchschnitt auf 13,74 % des Ausgangswertes. Am Ende konnten 98,7% des 0-Wertes nachgewiesen werden. Da die Patientin mittlerweile, ohne

die Möglichkeit einer erneuten Apheresetherapie kolikomiert wurde, kann Sie an keiner weiteren Apheresetherapie teilnehmen.

Tab. 16: Patient 2: Mittelwerte von Zellverläufen von Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil und eosinophil), Monozyten - Hk-Korrigiert

	0-Wert	Einstrom 15 min	Ausstrom 15 min	Einstrom 60 min	Ausstrom 60 min	Ende
Thrombozyten	100 %	103,84	13,74	99,93	104,98	98,71
Neutrophile Granulozyten	100 %	104,50	90,74	105,69	99,88	105,53
Eosinophile Granulozyten	100 %	100,55	69,30	84,73	98,54	80,94
Monozyten	100 %	101,60	55,27	111,07	67,48	108,56

4.3.3 Patient 3

Der Patient ist männlich, zum Zeitpunkt der Apheresetherapie 29 Jahre alt und erhielt die Diagnose der Colitis ulcerosa fünf Jahre zuvor. Er litt an einer mittelschweren Form, die auf eine Linkskolitis beschränkt und medikamentös mit 5-ASA und Glukokortikoiden eingestellt war. Seit der Diagnose im Jahr 2006 konnte keine medikamentöse Therapie die rektalen Blutungen des Patienten stoppen. Der Patient nahm bereits zuvor an einer Anwendungsreihe mit Immunopure® teil, die eine Remission für die Dauer von einem Jahr und zehn Monaten induzierte. Die Teilnahme an dieser Anwendungsbeobachtung führte zu einer Minderung der Stuhlfrequenz und einer Verbesserung im CAI von sieben auf drei Punkte. Thrombozyten konnten effektiv auf 19,9% im Ausstrom nach 15 min reduziert werden. Am Ende der Apherese konnten noch 91,3% nachgewiesen werden. Der Patient empfand die Apheresetherapie als „sehr lohnenswert“ und würde wieder an einer Apheresebehandlung teilnehmen.

Tab. 17: Patient 3: Mittelwerte von Zellverläufen von Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil und eosinophil), Monozyten - Hk-Korrigiert

	0-Wert	Einstrom 15 min	Ausstrom 15 min	Einstrom 60 min	Ausstrom 60 min	Ende
Thrombozyten	100 %	97,91	19,90	97,29	98,51	91,29
Neutrophile Granulozyten	100 %	114,56	102,64	113,37	106,76	110,20
Eosinophile Granulozyten	100 %	108,21	72,66	79,52	90,17	75,89
Monozyten	100 %	79,96	38,06	84,74	49,64	89,29

4.3.4 Patient 4

Die 33jährige Patientin war elf Jahre zuvor an Colitis ulcerosa erkrankt und litt an einer Pankolitis. Da Sie nach elf Jahren medikamentöser Therapie auf keine Steroide mehr reagierte, war sie medikamentös nur auf 5-ASA eingestellt. Die Patientin empfand die Apherese als „lohnenswert“, der CAI verbesserte sich von 13 auf fünf Punkte und der klinische Effekt hielt ein halbes Jahr an. Genau wie bei Patient 2, der ähnlich gut auf die Apherese reagierte, war auch bei Patient 4 die Reduzierung der Thrombozytenzahl durch die Apherese überdurchschnittlich: Im Mittelwert wurde die Thrombozytenzahl nach 15 min im Ausstrom auf 14,6% des 0-Wertes reduziert. Im Endwert konnte die Thrombozytenzahl auf 86% gesenkt werden. Des Weiteren konnten bei Patient 4 die Monozytenanzahl (nach 15 min auf 27,2% des Ausgangswertes im Ausstrom und nach 60 min auf 36,2% des Ausgangswertes im Ausstrom) und die Leukozytenkonzentration (auf 31,9% des Ausgangswertes nach 15 min im Ausstrom und 49,7% nach 60 min im Ausstrom) am stärksten reduziert werden. Im Interview empfahl die Patientin die Apherese „als eine gute Sache. Sollte als Behandlung zugelassen werden“ [203].

Tab. 18: Patient 4: Mittelwerte von Zellverläufen von Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil und eosinophil), Monozyten - Hk-Korrigiert

	0-Wert	Einstrom 15 min	Ausstrom 15 min	Einstrom 60 min	Ausstrom 60 min	Ende
Thrombozyten	100 %	97,90	14,63	89,57	77,97	86,01
Neutrophile Granulozyten	100 %	105,16	41,14	102,27	72,04	106,19
Eosinophile Granulozyten	100 %	115,77	25,26	95,37	121,63	76,82
Monozyten	100 %	98,81	27,17	98,14	36,18	92,33

4.3.5 Patient 5

Bei dem 45-jährigen männlichen Patienten wurde die Colitis ulcerosa ein Jahr vor der Anwendungsbeobachtung diagnostiziert. Er litt an einer Linkskolitis und war mit Glukokortikoiden, 5-ASA und Tacrolimus eingestellt. Die Apheresetherapie im Rahmen der Anwendungsbeobachtung begann bei einem einsetzenden akuten Schub und konnte diesen nicht verhindern. Der CAI betrug vor und nach Studienteilnahme zehn Punkte. Patient 3 war der Patient, bei dem die Thrombozytenzahl im geringsten Ausmaß gesenkt werden konnte: So betrug die Absenkung nach 15 min im Ausstrom 49,4% des 0-Wertes. Die Endkonzentration betrug 96,2%. Nichtsdestotrotz würde der Patient an weiteren Apheresetherapien gern teilnehmen, empfand sein Befinden durch die Therapie subjektiv als „verbessert“ und den Aufwand „lohnenswert“.

Tab. 19: Patient 5: Mittelwerte von Zellverläufen von Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil und eosinophil), Monozyten - Hk-Korrigiert

	0-Wert	Einstrom 15 min	Ausstrom 15 min	Einstrom 60 min	Ausstrom 60 min	Ende
Thrombozyten	100 %	97,43	49,43	96,07	102,83	96,15
Neutrophile Granulozyten	100 %	107,04	104,14	108,56	104,56	107,49
Eosinophile Granulozyten	100 %	98,90	107,14	96,05	94,13	89,92
Monozyten	100 %	102,16	84,20	83,76	68,40	93,00

4.3.6 Patient 6

Die 50jährige Patientin litt an einer Linkskolitis und erhielt die Diagnose Colitis ulcerosa fünf Jahre zuvor im Jahr 2006. Sie erhielt zum Zeitpunkt der Anwendungsbeobachtung 5-ASA und Glukokortikoide. Der CAI verbesserte sich von acht auf zwei Punkte und die Remission hielt knapp drei Monate an. Die Thrombozytenanzahl konnte nach 15 min im Ausstrom auf 47,1% des 0-Wertes reduziert werden. Am Ende betrug die Konzentration 95,4%. Die Patientin empfand ihr Befinden durch die Therapie als „leicht verbessert“, den Aufwand als gering lohnenswert und würde aufgrund einer stattgehabten Kolektomie an keinen weiteren Apheresetherapien teilnehmen.

Tab. 20: Patient 6: Mittelwerte von Zellverläufen von Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil und eosinophil), Monozyten - Hk-Korrigiert

	0-Wert	Einstrom 15 min	Ausstrom 15 min	Einstrom 60 min	Ausstrom 60 min	Ende
Thrombozyten	100 %	87,88	47,12	94,71	106,83	95,40
Neutrophile Granulozyten	100 %	117,50	116,57	116,78	113,06	115,96
Eosinophile Granulozyten	100 %	67,88	71,76	50,37	59,52	52,37
Monozyten	100 %	89,99	52,29	70,11	48,73	69,23

V Diskussion

Bei der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges Apherese-Verfahren in einem Rezirkulationsmodell in vitro in Bezug auf Wirkungsweise und Effektivität und in einer prospektiven Anwendungsbeobachtung in vivo an sechs Colitis ulcerosa-Patienten untersucht. In der Anwendungsbeobachtung wurden die teilnehmenden Patienten über fünf Wochen lang mit einer Therapieeinheit pro Woche behandelt. In Woche zehn wurde die Effektivität der Apherese evaluiert. Ein Jahr nach Ende der Anwendungsbeobachtung erfolgte eine Evaluierung der Patientenerfahrungen mittels Fragebogen und Telefoninterview.

5.1 Das Immunopure® Verfahren: Wirkung und Wirksamkeit

5.1.1 Diskussion: Effektivität der Apherese

Die Zytapherese-Behandlungen mit Immunopure® wurden von den Patienten gut toleriert und verminderte ihre Krankheitsaktivität. 67,7% erzielten eine Remission, 83,3% haben nach Re-Evaluierung in Woche 10 auf die Therapie angesprochen.

Die Remission war dabei definiert als das Erreichen eines CAI von weniger als vier Punkten – klinisches Ansprechen als eine Verbesserung von mindestens drei Punkten. Eine endoskopische Evaluierung zur Verlaufsbeurteilung der Mukosa erfolgte nicht. Am meisten profitierte eine 27-jährige Patientin mit einer Verbesserung des CAI um neun Punkte. Im Durchschnitt verbesserte sich der CAI der Patienten, sofern diese auf die Therapie ansprachen, um 6,4 Punkte. Funktionsstörungen etwaiger Organe oder des Kreislaufsystems wurden nicht beobachtet. Dies bestätigt die Ergebnisse, welche in einer ersten Studie von Ramlow et al. erhoben werden konnten [1].

Im Vergleich zu anderen Verfahren wirkte Immunopure® besonders effektiv bei der Eliminierung von Thrombozyten. Nachfolgend werden die Effekte von Immunopure® auf verschiedene Zellen erläutert. Zusammenfassend zeigt die Tabelle Nr. 4 in Kapitel 1.2.2.5. „Übersicht - Vergleich der Apherese-Verfahren“ auf Seite 23 und 24 die Wirkung von Immunopure® auf verschiedene Zellen im Vergleich zu anderen auf dem Markt erhältlichen Zytapherese-Systemen.

5.1.2 Wirkung auf Thrombozyten

Verschiedene Studien konnten bereits den Zusammenhang zwischen einer effektiven Thrombozytenelimination und dem Therapieerfolg einer Apherese belegen [204, 205].

Bei einer aktiven Colitis ulcerosa ist nicht nur die Anzahl der Thrombozyten im Blut erhöht - sie korreliert auch mit der Krankheitsaktivität [53]. Des Weiteren geht mit einer Vermehrung der Thrombozyten auch eine vermehrte Bildung von Mikropartikeln, anderen

inflammatorischen Zellen (CD40/CD40L, sCD40L) [73] sowie Zelladhäsionsmolekülen wie sP-Selektinen [64] einher – mitsamt einer verstärkten Entzündungsreaktion.

Immunopure® konnte sowohl in den in vitro-Versuchen als auch in vivo die Thrombozytenanzahl signifikant reduzieren. Auffällig ist, dass die Thrombozytenanzahl nach 15 Minuten durch die Adsorberpassage sowohl in vitro als auch in vivo am stärksten reduziert werden konnte, sich die Anzahl der Thrombozyten in den in vivo-Versuchen (und schwächer auch in den in vitro-Versuchen) zum Ende einer Apheresetherapie jedoch wieder dem Ausgangswert näherte. Brubaker erklärt diesen Effekt, der bereits in anderen Studien beobachtet wurde, durch einen erhöhten Nachstrom von Zellen aus Endothelium, Milz oder Knochenmark [206]. Außerdem muss ein Sättigungseffekt der PAR-Kugeln diskutiert werden. Die starke Adsorption von Thrombozyten an Immunopure® wurde auch in den elektronenmikroskopischen Bildern der PAR-Kugeln deutlich (siehe Abbildungen 14 A-I). Zwischen den einzelnen Apheresebehandlungen wurde keine dauerhafte Reduzierung und somit eine mögliche klinisch kritische Thrombozytopenie beobachtet. Während Immunopure® bis zu 80% der Thrombozyten eliminiert, zeigen andere Verfahren eine deutlich geringere oder gar keine Wirkung auf Thrombozyten [1, 151, 164]. Auch im Rezirkulationsmodell zeigte sich eine Erholung der Thrombozytenanzahl im Verlauf der Apherese, obwohl hier kein erhöhter Nachstrom von Zellen aus anderen Kompartimenten möglich ist. Dies ist vermutlich auf eine Sättigung der Adsorbersäule zurückzuführen. Bei Analyse der einzelnen Kasuistiken fällt auf, dass die Patienten 2 und 4, bei denen die Thrombozyten am effektivsten eliminiert werden konnten, am stärksten von der Apheresetherapie profitierten. Bei Patient 5 wurde die Thrombozytenanzahl im geringsten Maße reduziert. Bei diesem Patienten begann die Apherese bei einem einsetzenden akuten Schub und konnte diesen nicht verhindern. Der CAI betrug vor und nach Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung zehn Punkte. Möglicherweise hätte der Patient von einer intensivierten Form einer Apherese besser profitiert.

5.1.3 Wirkung auf Vitalparameter

Blutdruck und Puls der Patienten waren zum Ende einer Apheresebehandlung, im Vergleich zu den Messdaten zu Beginn der Apherese, erniedrigt. Dies ist vermutlich auf verschiedene Faktoren zurückzuführen, wie beispielsweise die erneute Messung in liegender Position und einer bei extrakorporalen Verfahren wiederholt beobachteten Hypotonie. Die Differenz in der Herzfrequenz und Blutdruckamplitude verminderte sich im Zeitraum der Anwendungsbeobachtung und ist daher möglicherweise auch auf Anspannung und Nervosität der Patienten bei Therapiebeginn zurückzuführen.

Die klinischen Ergebnisse bestätigten die Erfahrungen bei der ersten Anwendung des Immunopure®-Verfahrens durch Ramlow et al. [1].

5.1.4 Wirkung auf weitere Target-Zellen

Das Immunopure®-Verfahren wird zu den Zytapherese-Verfahren gezählt und konnte Target-Zellen in vivo und in vitro effektiv eliminieren. In der akuten Entzündungsphase der Colitis ulcerosa wird die Mukosa durch Zellen wie Granulozyten und später auch mit T- und B-Lymphozyten als Reaktion des intestinalen Immunsystems infiltriert. Vor allem in der Lamina propria befinden sich im akuten Schub zahlreiche Granulozyten, die durch die Freisetzung von u.a. proinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren Gewebsschädigungen hervorrufen und die Entzündungsreaktion weiter fördern [207]. Target-Zellen der Apherese mittels Immunopure® waren daher neben Thrombozyten auch weitere Zellen wie Monozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten.

Wir untersuchten des Weiteren CD-Marker, um die Ergebnisse des Blutbildes zu verifizieren und weitere Zellpopulationen zu analysieren. Vor allem die CD14+CD16+-Monozyten waren aufgrund ihrer proinflammatorischen Komponente und als bekannte TNF-α Quelle [209] von Interesse. Monozyten konnten durch Immunopure® effektiv eliminiert werden: In den in vitro-Versuchen zeigte sich im Blutbild eine Reduzierung um bis zu 70%. In der Anwendungsbeobachtung bestätigten sich die Ergebnisse. So konnte die Zahl der Monozyten nach 60 min um durchschnittlich 66% reduziert werden.

Die Analyse der CD14+-Monozyten und CD14+CD16+-Monozyten in der Durchflusszytometrie bestätigten diese Ergebnisse. CD14+Monozyten sind Förderer autoreaktiver T-Zellen, welche im Verdacht stehen, die Entzündung der Colitis ulcerosa zu beeinflussen [209]. CD16+ tragende Monozyten sind eine der wichtigsten Quellen des proinflammatorischen TNF-α [152]. Beide Zellsorten konnten durch die Apherese mittels Immunopure® wirksam eliminiert werden: CD14+ Monozyten konnten in vitro um 61% und in vivo um 69,3% reduziert werden. CD14+CD16+tragende Monozyten wurden in vitro um 59,5% und in vivo um 47,1% gesenkt. Eine eliminierende Wirkung auf CD14+CD16+ tragende Monozyten wurde zuvor auch durch Adacolumn® beobachtet [210]. Während Immuloc® und Adacolumn® in der Wirkung auf Monozyten Immunopure® beim Vergleich mit Daten unterschiedlicher Patientengruppen unterlegen sind, kann Cellsorba® in Studien bis zu 90% der Monozyten entfernen [147, 164].

Letztlich ist lediglich Cellsorba® effektiver in der Eliminierung von Monozyten als Immunopure®. Bei den Granulozyten müssen vor allem neutrophile Granulozyten als wesentliche Produzenten entzündungsfördernder Zytokine genannt werden [207]. In den in vitro-Versuchen konnte eine Reduktion der neutrophilen Granulozyten durch Immunopure® um 30% nachgewiesen werden. In der Anwendungsbeobachtung wurde sogar eine Reduktion um 40% beobachtet. Zwar werden nach der Eliminierung neue neutrophile Granulozyten gebildet - diese haben jedoch weniger inflammatorische Eigenschaften als ausgereifte neutrophile Granulozyten [142]. Die basophilen Granulozyten konnten in vitro durch die Apherese um 60% reduziert werden. Diese

Ergebnisse ließen sich in der Anwendungsbeobachtung nicht reproduzieren: Zwar sank die Anzahl basophiler Granulozyten temporär um ca. 40% - zum Ende der Apherese konnte jedoch nur eine Reduktion um 15% verifiziert werden. CD10 wird von Granulozyten, unreifen B-Zellen und lymphoiden Vorläuferzellen exprimiert und durch Immunopure® um ca. 50% reduziert. CD11b+ ist ein Zelladhäsionsprotein, welches v.a. von Monozyten, Makrophagen und Granulozyten gebildet wird. Immunopure® senkte die Zahl von CD11b+-Zellen um die Hälfte. Des Weiteren reduzierte Immunopure® die Anzahl von Zellen, welche sowohl CD11b+ als auch CD62L+ tragen. CD62L vermittelt als Adhäsionsmolekül zwischen Blutplättchen und weiteren Zellen, wirkt prothrombogen und korreliert in der Anzahl bei Colitis ulcerosa-Patienten mit der Krankheitsaktivität [211]. CD62L+-Zellen konnten ebenfalls durch Immunopure® reduziert werden. Die eosinophilen Granulozyten konnten sowohl in vitro als auch in vivo um ca. 40% reduziert werden. Die vermehrte Aktivierung der T- und B-Lymphozyten bei CED-Patienten zeigt sich sowohl in der Lamina propria, als auch im peripheren Blut und führt zur proinflammatorischen Kaskade [207]. Immunopure® eliminierte in vitro und in vivo nur ca. 10% der Lymphozyten. CD3+ und CD4+ Marker werden von T-Helferzellen exprimiert und sind im entzündeten Gewebe bei Colitis ulcerosa Patienten in wesentlich höherem Maße nachweisbar als bei Nicht-Erkrankten [212]. Immunopure® beeinflusste weder in den in vitro- noch in den in vivo-Versuchen die Anzahl der CD3+CD4+- oder CD3+CD8+-Zellen. CD3+HLA-DR+ und TCRgd+ werden auf aktivierten T-Zellen exprimiert, sind vor allem in der Mukosa des Darms zu finden und konnten als besonders aktiv [213] bzw. in erhöhter Anzahl bei Colitis ulcerosa-Patienten dargestellt werden [214]. Auf diese Zellpopulationen [215] zeigte sich weder in den in-vivo-Versuchen noch in vitro im Immunopure® Minimodul oder im Leermodul eine eliminierende Wirkung von Immunopure®. Während Adacolumn® und Immuloc® gar keine Wirkung auf Lymphozyten erzielen, eliminiert Cellsorba® bis zu 70% der Lymphozyten.

5.1.5 Wirkung auf Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate

Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate bilden sich beim Menschen bspw. im Rahmen von Entzündungen oder thrombotischen Ereignissen. Auch gesunde Menschen stellen Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate her - bei CED-Patienten wurden jedoch deutlich erhöhte Zahlen dieser Zellaggregate im Vergleich zu nicht erkrankten Menschen festgestellt [216]. Erhöhte Aggregatanzahlen wurden bspw. im mesenterialen Gefäßendothel von Colitis ulcerosa-Patienten gefunden. Dies unterstützt die Hypothese, dass aktiviertes Gefäßendothel die Bildung der Aggregate fördert [217]. Die Aggregate werden durch die Bindung der Leukozyten am P-Selektin der Thrombozyten gebildet und triggern die Expression von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, welche wiederum die Transkription proinflammatorischer Moleküle fördern [218]. V.a. CD42b+- und

CD42b+CD11b+- Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate scheinen zur Pathogese mukosaler Läsionen und zum erhöhten Risiko systemischer Thrombosen bei Colitis ulcerosa beizutragen [217]. Das Verhindern dieser Aggregatbildung ist für die Therapie der CED vermutlich von Nutzen. Auf Thrombozyten-Monozyten-Aggregate (CD42b+CD14b+) wirkte Immunopure® stark eliminierend, während auf Thrombozyten-T-Zell-Aggregate (CD42b+CD3+) und Thrombozyten-CD11b-Aggregate zwar nach 15 Minuten eine gute Wirkung dargestellt werden konnte, diese sich jedoch zum Ende der Apherese nicht mehr zeigte. Dennoch könnte auch eine vorübergehende Elimination von Zellaggregaten aufgrund der proinflammatorischen Eigenschaften von Thrombozyten und Monozyten modulierende Effekte haben. Eine eliminierende Wirkung kam im Rezirkulationsmodell dabei nur in den Immunopure®-Minimodulen zur Darstellung – im Leermodul zeigte sich kein eliminierender Effekt. Neben der Apherese kann eine eliminierende Wirkung auf Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate auch durch Thrombozytenaggregationshemmer wie Clopidogrel und Prasugrel sowie durch Abciximab beobachtet werden [218].

5.1.6 Wirkung auf Aktivierungsmarker

Weiterhin wurden Aktivierungsmarker auf Zellen und Thrombozyten untersucht. CD62P+ und CD63P+ werden von aktivierten Thrombozyten exprimiert und dienen u.a. der Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen. CD62P+ Marker wurden bei Colitis ulcerosa Patienten in höherer Anzahl nachgewiesen [215] und konnten in einer vorhergehenden Studie durch die Leukozytenapherese reduziert werden [205].

Fukunaga und Mitarbeiter konnten bei Respondern auf eine Apheresetherapie einen signifikanten Abfall der CD63+- und CD62-P-Thrombozyten als prädiktive Parameter der klinischen Remission nachweisen [205]. Auf CD42b+CD62P+- und CD42b+CD63P+-Thrombozyten zeigte Immunopure® keine eliminierende Wirkung – die Anzahl der aktivierten Thrombozyten stieg sogar durch die Apherese in den in vitro- und in vivo-Versuchsreihen. In vivo war ein Anstieg der Aktivierungsmarker im Immunopure®-Minimodul als auch im Leermodul zu erheben. Die Aktivierung von Zellen ist vermutlich durch den Kontakt mit künstlichen Oberflächen wie den Blutschläuchen oder der physikalischen Wirkung der Blutpumpe zu erklären. Aufgrund dieser Wirkungen der Scheinapherese muss postuliert werden, dass eine Scheinapherese nicht mit einem Placebo verglichen werden und eine stärkere therapeutische Wirkung als diese haben kann [217]. Die Expression des CD62L-Markers wurde durch die Aktivierung der Zellen im Rahmen der Apherese und Scheinapherese reduziert. CD11b-Marker hingegen wurde durch die Zellaktivierung deutlich mehr exprimiert. Bei einer Reihe Aktivierungsmarker, die nach Zellaktivierung exprimiert oder herunterreguliert werden, sind bedingt durch Zellaktivierung die gleichen Effekte sowohl in den gefüllten Modulen als auch in den

Leermodulen beobachtet worden (bspw. CD42b+CD63+-Zellen, CD42b+CD62P+-Zellen, CD3+HDLA-DR+-Zellen, MeanCD11b+-Zellen). Abschließend kann geurteilt werden, dass sich die Ergebnisse der Anwendungsbeobachtung im Rezirkulationsmodell weitestgehend reproduzieren ließen. Das Modell war daher dafür geeignet, Adsorptionsprozesse am Adsorber zu analysieren. Bei der Untersuchung der Leermodule war bei den meisten Zellen nur eine geringe Wirkung im Rahmen einer Scheinapherese oder gar keine Wirkung zu erheben. Wechselwirkungen mit anderen Elementen wie Organen oder Medikamenten waren im Rezirkulationsmodell ausgeschlossen.

Ein auffälliger Unterschied des Rezirkulationsmodells im Vergleich zur Anwendungsbeobachtung besteht darin, dass die Anzahl einzelner Zellen zum Ende der in vivo-Versuche meist deutlich höher war, als am Ende der in vitro-Versuche. Dies ist, wie bereits erwähnt, sowohl durch einen Sättigungseffekt der PAR-Kugeln als auch durch zusätzlichen Nachstrom neuer Zellen aus anderen Kompartimenten in vivo bedingt.

5.1.7 Wirkung auf Mikropartikel, sP-Selektin und CD40L

Neben Thrombozyten spielen auch von Thrombozyten sezernierte Faktoren und Partikel wie Mikropartikel, sP-Selektin [64] und CD40L [72, 70] eine relevante Rolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung der Entzündungskaskade der Colitis ulcerosa.

Obwohl es nur wenige Studien zur Wirkung der Mikropartikel auf die Entzündungskaskade in Colitis ulcerosa Patienten gibt, wird davon ausgegangen, dass diese proinflammatorisch und prothombogen wirksam sind [64]. Sowohl in vitro als auch in vivo wurde ein Anstieg der Anzahl der Mikropartikel nach 15 min festgestellt, welche dann durch die Apherese nach 15 min im Ausstrom signifikant reduziert werden konnten.

Dies ist vermutlich auf eine verstärkte Plättchenaktivierung zurückzuführen.

Die Endmessungen nach 60 min zeigten jedoch keine signifikante Reduzierung der Mikropartikel. Die Ursache der Reduktion nach 15 min - nicht aber nach 60 min - bleibt unklar. Letztlich hat Immunopure® vermutlich keinen großen Einfluss auf Mikropartikel. Eventuell spielt auch hier eine Sättigung des Säulenmaterials eine Rolle - möglicherweise werden auch weitere Mikropartikel im Verlauf durch aktivierte Thrombozyten nachgebildet. Inwieweit sich diese neueren Mikropartikel von zuvor produzierten Mikropartikeln unterscheiden, sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. In den in vitro-Untersuchungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit PAR-Kugeln gefüllten Minimodulen und der Scheinapherese. Die hohe Expression der Thrombozytenaktivierungsmarker CD63 und CD62P ging einher mit einer verstärkten Sezernierung von CD40L in vitro und in vivo, sowohl im Einstrom, in stärkerem Maße aber im Ausstrom. Ein Anstieg des Plasma-CD40 wurde auch im Leermodul beobachtet - jedoch um den Faktor 2-3 geringer als im gefüllten Modul.

CD40L, oder CD154 genannt, ist ein kostimulatorisches Molekül und wird primär auf aktivierte T-Zellen exprimiert, kann aber auch von Thrombozyten sezerniert werden.

Es bindet an CD40 auf Antigen-präsentierenden Zellen und löst damit in Abhängigkeit von der Zielzelle viele Effekte aus, die insgesamt zu einer verstärkten Inflammation führen können [219]. In der experimentellen Kolitis vermittelt der CD40/CD40L Signalweg die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an das Gefäßendothel [220]. Ob jetzt die erhöhten CD40L-Spiegel nach Immunopure®-Apherese inflammatorische Auswirkungen haben könnten oder aber den Einstrom an Thrombozyten und / oder Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten in den Darm verhindern, sollte in weiteren Studien untersucht werden. Durch Expression von Adhäsionsmolekülen wie Selektinen auf Endothel und Zellen wie Thrombozyten oder Leukozyten wird eine verstärkte Extravasation dieser Zellen in das entzündete Gewebe hervorgerufen. Hierdurch entstand die Idee, durch Elimination dieser Adhäsionsmoleküle den Entzündungsprozess zu limitieren.

Weder in den in vitro- noch in den in-vivo-Versuchen zeigte sich eine Reduktion der Konzentration von P-Selektinen. Neben Thrombozyten exprimieren auch andere Zellen wie Leukozyten Selektine (L-Selektine). Bei anderen Adsorbern wie Adacolumn® [144] oder Immuloc® [164] konnte eine Wirkung auf L-Selektine nachgewiesen werden.

5.1.8 Bilder mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop

Auf den Bildern des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops kann man die Zelladhäsion an PAR-Kugeln und die starke Bindung von Thrombozyten erkennen. Es zeigt sich eine Adsorption von Fibrinogen, CD42b+, Thrombozyten, CD11b+, CD14 und CD3+ Leukozyten auf der Kugeloberfläche. Aus diesen Beobachtungen lässt sich für den Mechanismus der Adsorption folgendes Modell postulieren: Thrombozyten aus dem Blutstrom initiieren nach Kontakt mit den künstlichen Oberflächen des Adsorbers die Koagulationskaskade. Durch das entstehende Fibrin bilden Thrombozyten Komplexe mit Leukozyten, die so aus dem peripheren Blut über das Adsorbermaterial entfernt werden. Die Adhäsion von Fibrin, Thrombozyten und Leukozyten auf der Adsorberoberfläche ist auch auf den elektronenmikroskopischen Bildern erkennbar (Abb. 87).

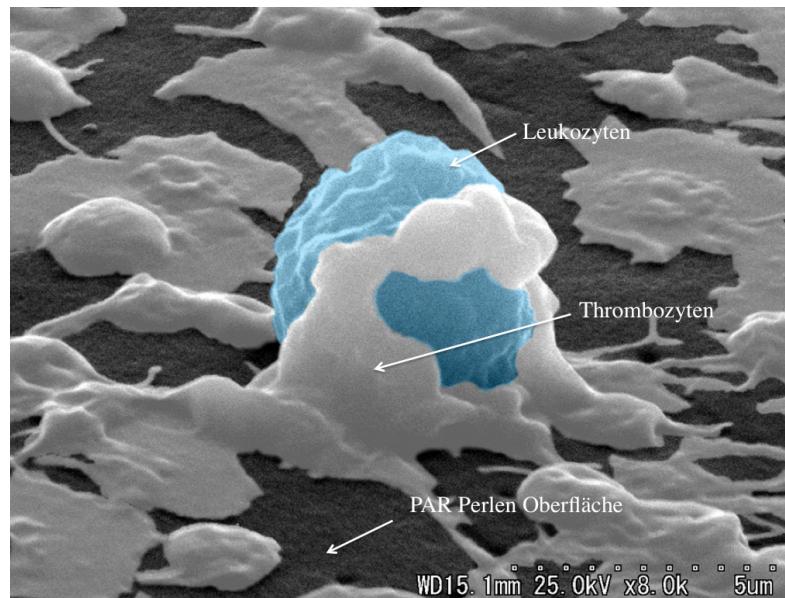


Abb: 23: PAR-Oberfläche mit anhaftenden Leukozyten und Thrombozyten [221]

Ferner ist bekannt, dass Immunkomplexe an zellulische Oberflächen gebunden werden, an welche Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten durch den Fc-Gamma Rezeptor gebunden werden [217].

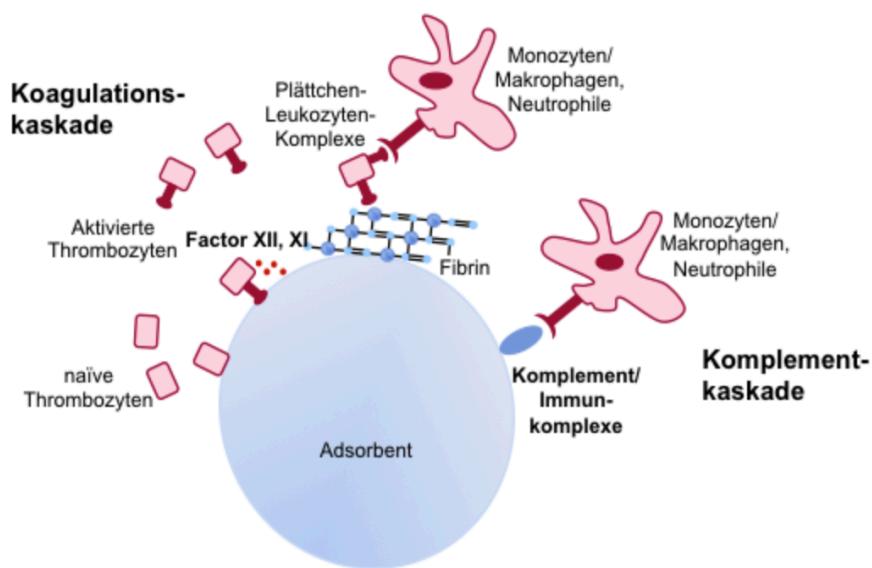


Abb: 24: Postulierte Wirkung der Adsorption von Plättchen-Leukozyten-Komplexen an Fibrin und weiterer Zellen wie Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie der Adsorption von Zellen / Zellaggregaten an dem Adsorber über Komplement- / Immunkomplexe [217]

5.1.9 Sicherheit

In der Anwendungsbeobachtung konnten alle Patienten 100% der geplanten Apheresebehandlungen mit Immunopure® absolvieren. Die Apherese wurde dabei von allen Patienten gut vertragen. Auch eine Re-Evaluierung mittels eines Fragebogens und telefonischer Nachsorge ein Jahr später bewertete die Studiendurchführung und die Apherese als Therapie durchgehend positiv [203]. Dies bestätigt die guten Ergebnisse, die in der erstmaligen humanen Anwendung von Immunopure® durch Ramlow et al. sowie auch in Tierversuchen erhoben werden konnten [1, 217]. Auch den anderen auf dem Markt erhältlichen Systemen wurden in bisherigen Studien gute Sicherheitsprofile bescheinigt: Eine Cochrane-Analyse von neun Studien von Yoshino et al. [187] aus dem Jahr 2018 bewertete die Granulozyten/Monozyten Apherese als sichere und effektive Behandlungsmethode. Eine Post-hoc-Analyse einer großen Studie an 116 japanischen Krankenhäusern mit 847 Patienten konnte die Sicherheit auch der Leukozytenapherese bestätigen [222].

5.2 Die Apheresetherapie im Vergleich mit - sowie unter Einbeziehung der konventionellen Therapie

Vielen Patienten kann mit einer konventionellen Therapie gut geholfen werden. Insbesondere die Einführung der neuen Immunsuppressiva stellt eine enorme Verbesserung der Therapiemöglichkeiten dar. Jedoch gibt es weiterhin Bedenken in Bezug auf die langfristige Wirkung und Toxizität dieser Medikamente. Die medikamentöse Therapie kann bei mehr als 10% der Patienten keine langfristige Remission etablieren [223]. Darüber hinaus ist die konventionelle Therapie bei steroidrefraktären und -abhängigen Verläufen häufiger wirkungsarm und führt durch die oft hohe Nebenwirkungsrate in der Langzeittherapie zu therapeutischen Problemen.

Letztendlich nimmt man diese Nebenwirkungen jedoch aus Mangel an Alternativen zur Remissionsinduktion und –erhaltung in Kauf. Als Ultima Ratio hilft solchen Patienten oft nur die Kolektomie. Nach einer Studie aus dem Jahr 2015 geben zwar 84% der Patienten eine Verbesserung der Lebensqualität im Vergleich zum Befinden vor der Operation an, jedoch beschreiben auch 81% Probleme in Bezug auf Depressionen, Arbeitsproduktivität, Diätrestriktionen, Körperbild und/oder sexueller Funktion [224]. Letztendlich ist die Kolektomie eine große chirurgische Intervention mit einhergehenden Risiken und einem Einschnitt in die Lebensqualität und Gewohnheit des Patienten. Die moderne Medizin verfolgt das Ziel, durch immer bessere Therapiemöglichkeiten bei niedrigeren Risiken und Nebenwirkungen Menschen zu helfen. Daher ist es bemerkenswert, dass die Apheresetherapie meist nur spät, additiv und als Ultima ratio zum Einsatz kommt. Während die Apheresetherapie für die Behandlung von Patienten mit Colitis ulcerosa und

Morbus Crohn in Japan seit vielen Jahren etabliert ist, wird die Apherese in der 66 Seiten langen aktuellen Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) zur Therapie der Colitis ulcerosa [94] sowie in den Guidelines der europäischen Organisation für Colitis und Crohn (ECCO) aus dem Jahre 2017 [10] nicht erwähnt. Lediglich das ECCO-Konsenspapier zur Behandlung der Colitis ulcerosa in der Pädiatrie erwähnt die Apherese. In den Empfehlungen aus dem Jahre 2012 wird die Apherese als umstrittene Therapie beschrieben, welche bei Kindern mit mildem bis moderatem Erkrankungsstatus erwogen werden kann, wenn keine andere Option zur Verfügung steht [225]. Das aktuelle ECCO-Konsenspapier für Pädiatrie aus dem Jahr 2018 erwähnt die Apherese als möglichen Therapieversuch bei steroidabhängigen oder –resistenten Kindern [226]. Der geringe Beachtungs- und Empfehlungsgrad ist v.a. auf die uneinheitliche Studienlage zurückzuführen. So wurden die bisher überwiegend positiven Erfahrungen im Rahmen kleinerer Studien gewonnen, in denen doppelblind bzw. randomisiert erhobene Vergleichsdaten fehlen. Dem gegenüber stehen bisher zwei doppelblinde, randomisierte Studien entgegen. Während eine Studie von Sawada et al. aus dem Jahre 2005 bei 19 Patienten in der Apheresegruppe mit einer Remissionsrate von 80% gegenüber 33% in einer Scheinapheresegruppe positive Ergebnisse darstellen konnte [149], zeigte die Studie von Sands et al. aus dem Jahr 2008 keinen signifikant positiven klinischen Effekt der Zytapherese im Vergleich zur Scheinapherese [159]. Diese Studie hat bei vielen europäischen Ärzten den Eindruck erweckt, die Apherese habe keinen relevanten Nutzen in der Therapie der Colitis ulcerosa [227] und stellt die positiven Ergebnisse vorheriger Studien an über 20.000 Patienten in Frage. Nach Veröffentlichung der Studienergebnisse wurden mehrere Kritikpunkte an der Studiendurchführung laut: So wurde erstmals der Mayo-Score angewandt, der in bisher noch keiner derartigen Studie verwendet wurde. Außerdem wurden die variabel gehaltenen Einschlusskriterien, eine sehr heterogene Studienpopulation mit wenig aktiv erkrankten Patienten und die fehlende Erfahrung der Behandlungszentren, kritisiert. So konnte eine Subgruppenanalyse innerhalb dieser Studie aus Daten von 63 Patienten mit erosiven und/oder ulzerativen Veränderungen der Darmschleimhaut eine signifikante Überlegenheit der Zytapherese gegenüber der Scheinapherese in Bezug auf eine klinische Remission sowie klinisches Ansprechen belegen [159]. Dennoch hat die Apherese das Potential, nicht nur additiv in der konventionellen Therapie zu agieren, indem sie Dosierungen und somit Nebenwirkungen minimiert, sondern auch chirurgische Interventionen hinauszögert bzw. sogar vermeidet. Diverse Studien konnten dabei zeigen, dass die Apheresetherapie einer Therapie mit Steroiden sogar überlegen sein kann. In dieser Anwendungsbeobachtung konnten 83% der Patienten von der Apherese profitieren (fünf von sechs Patienten), 67% gingen sogar in Remission (vier von sechs Patienten). Die technische Durchführbarkeit dieser Anwendungsbeobachtung lag bei

100%. Relevante Zwischenfälle oder Nebenwirkungen wurden nicht erhoben – damit entspricht Immunopure® dem guten Sicherheitsprofil anderer Aphereseverfahren. Die Ergebnisse entsprechen den guten Erfahrungen mit Immunopure®, welche zuvor Ramlow et al. bereits in einer Pilotstudie mit 10 Patienten und einer Remissionsrate von 80% erheben konnte [1]. Eine Studie aus dem Jahr 2019 von Kruis et al. konnte ebenfalls ein gutes Ansprechen (75%) bei jedoch nur geringer Remissionsrate (25%) erzielen. Dabei verglichen Kruis et al. erstmals die Apherese mit Immunopure® mit einer Vergleichsgruppe, in der Patienten mit therapierefraktärer Colitis ulcerosa mit Steroiden behandelt wurden. Sowohl bzgl. des Therapieansprechens als auch der Remissionsrate war die Apherese der Steroidtherapie überlegen [228]. Wenn man nun die Ergebnisse der bisher veröffentlichten Studien über Immunopure®, inklusive dieser Anwendungsbeobachtung, zusammenfasst, zeigt sich bei 29 Patienten ein durchschnittliches Ansprechen von rund 78%. Wie in Kapitel 1.2.2.5 auf Seite 24 aufgeführt, wurden in bisherigen Studien für Adacolumn® Ansprechraten von ca. 75% und für Cellsorba® von ca. 70% beschrieben. Im Vergleich mit anderen auf dem Markt erhältlichen Apheresesystemen zeigt Immunopure® daher ähnlich gute Ergebnisse.

Tab 21: Übersicht über bisherige Studien / AWB mit Immunopure®

Autor	Jahr	Indikation	Patienten in finaler Analyse	Generelles Ansprechen
Ramlow [1]	2013	Moderat- bis schwere, therapierefraktäre CU	10	80% (8/10)
Kruis [228]	2019	aktive CU trotz 5-ASA-Therapie	13	75% (9/12)
Diese AWB	2013	Moderat- bis schwere, therapierefraktäre CU	6	80% (5/6)

Besonders profitierten mit den Patienten 2 und 4 diejenigen von der Apheresetherapie, bei denen die Zahl der Thrombozyten am effektivsten reduziert werden konnte.

Bei Patient 5, der in einem akuten Schub therapiert wurde, wurden die Thrombozyten in geringstem Maße reduziert. Der Patient konnte als einziger nicht von der Apherese profitieren. Dies bestätigt die bisherigen Erfahrungen anderer Studien, die einen Zusammenhang zwischen einer effektiven Thrombozytenelimination und dem Therapieerfolg einer Apherese darstellten [204, 205]. Des Weiteren stützen diese Ergebnisse die These, dass die Thrombozyten als wichtiger Bestandteil in der

Pathogenese der Colitis ulcerosa ein Target in der Therapie sein sollten und durch Immunopure® effektiv therapiert werden können. Die Nachsorge ein Jahr nach Ende der Anwendungsbeobachtung erbrachte eine positive Rückmeldung der Patienten.

So profitierten alle Patienten subjektiv von der Teilnahme an der Anwendungsbeobachtung. Mit Bezug zum organisatorischen Aufwand einer Apheresetherapie mit An- und Abreise sowie dem zeitlichem Aufwand empfanden zwei Patienten den Ertrag der Therapie im Vergleich zum Therapieaufwand als sehr lohnenswert, drei als lohnenswert und nur eine Person als gering lohnenswert. So sind die größeren Therapieumstände einer Apheresetherapie sicherlich als Nachteil gegenüber der konventionellen Therapie zu nennen. Patienten sind während der Therapie an der Erhaltung ihres Alltages und einer möglichst hohen Lebensqualität, auch in aktiven Phasen der Erkrankung, interessiert. Für viele Patienten mag eine tägliche Medikamenteneinnahme, die bei Wohlbefinden oft nicht entsprechend erfolgt, angenehmer erscheinen, als der Aufwand einer extrakorporalen Blutreinigung.

Die Bereitschaft für eine solche Therapieform scheint sich erst bei intensiveren Symptomen und tiefgreifenden Einschnitten in die Lebensqualität zu entwickeln. Vor allem dringliche Symptome wie rektale Inkontinenz mindern die Lebensqualität und lassen aufwendigere Therapiekonzepte attraktiv werden [229]. In der Nephrologie gab es in den letzten Jahren große Bemühungen und Fortschritte in der Entwicklung eines tragbaren Dialysegerätes [230]. Ein solches mobiles Apheresegerät – möglicherweise im Rahmen einer „Heim-Apherese“ – könnte auch hier einen Lösungsansatz darstellen. Ein weiterer Nachteil der praktischen Umsetzung der Apheresetherapie besteht darin, dass die betreuenden Gastroenterologen meist über wenig Expertise im Umgang mit extrakorporalen Blutreinigungsverfahren verfügen. Somit sind Aphereseverfahren primär nur in großen Kliniken und Zentren, in denen Hämatologen und Gastroenterologen interdisziplinär zusammenarbeiten können, zu realisieren. Des Weiteren sind bei Kindern und ängstlichen Patienten Probleme beim Umgang mit großlumigen Punktionsnadeln zu erwarten. Wie schon Conrad darstellte, wünschen sich viele Patienten mehr Therapieoptionen in der Therapie der Colitis ulcerosa [2]. Eine solche Option stellt die Apherese dar und sollte Patienten als mögliche Alternative vorgestellt werden.

5.3 Diskussion: Wie kann die Apheresetherapie möglichst sinnvoll im Therapieregime der Colitis ulcerosa angewandt werden?

Die bisherigen Studienergebnisse bzgl. der Apherese selbst, als auch bzgl. Immunopure®, zeigen in Wirkung und Remissionsinduktion ein unheiliches Bild. Dies lässt darauf schließen, dass die Apherese nicht bei allen Patienten gleichermaßen wirkt und möglicherweise nur ein gewisses Patientenkollektiv von der Apherese profitiert. Um den möglichst idealen Standpunkt der Apheresetherapie im Therapieregime der Colitis

ulcerosa zu umreißen, sollte zunächst einmal herausgestellt werden, in welcher Weise die Apheresetechnologie noch optimiert werden kann und somit auch, welchen Forschungsschwerpunkt zukünftige Studien haben könnten. Wie die folgende Tabelle darstellt, unterscheiden sich derzeitige Verfahren in Funktion und Anwendung von einer optimalen Wirkungsweise noch sehr:

Tab. 22: Das ideale Aphereseverfahren vs. den derzeitigen Stand

Das ideale Verfahren	Derzeitige Verfahren
kommt frühzeitig im Krankheitsverlauf zum Einsatz	kommen spät, innerhalb von Studien zum Einsatz
wird selektiv bei Patienten angewandt, die davon profitieren können	kommen unselektiv bei Patienten zum Einsatz
mildert effektiv den akuten Schub und repariert bestehende Schäden	wirken sehr unterschiedlich in Bezug auf Effektivität und Therapie bestehender Schäden
ist nebenwirkungsarm	sind nebenwirkungsarm
selektioniert intelligent die schädigenden Zellen in einem zu beeinflussendem Ausmaß	selektionieren nicht beeinflussbar und in unterschiedlichem Ausmaß verschiedene Zellen
kommt ohne andere Medikamente aus	kommen ohne weitere Medikamente aus und sparen Dosierungen in der Standarttherapie ein
beeinflusst den Patienten in seiner Freiheit und Mobilität nicht	zwingen den Patienten temporär zur Immobilität
wird von der Krankenkasse bezahlt	werden nicht von der Krankenkasse bezahlt
ist Ärzten und Patienten bekannt und wird im Therapieregime angeboten	sind auf Patientenseite sehr unbekannt und kommen nur selten zur Diskussion

Um die Verfahrens- und Anwendungsweise zu optimieren, sollte es in Zukunft größere Studien mit einem größeren und homogeneren Patientenkollektiv geben. Bedauerlicherweise konnte die bisher größte durchgeführte doppelblind randomisierte Multicenter-Studie von Sands et al. die bisherigen positiven Erfahrungen nicht bestätigen [159]. Die meisten Daten wurden bisher aus Studien mit anderen Apheresesystemen wie Adacolumn® und Cellsorba® gewonnen. Rückschlüsse auf das Immunopure®-Apheresystem sind daher nur unter Vorbehalt zu ziehen. In zukünftigen Studien sollte unter anderem ermittelt werden, in welchem Krankheitsstadium die Zytapherese die bestmögliche Wirkung hat. Die Kasuistiken der Patienten 2 und 4 zeigen, dass Immunopure® vor allem bei langdauernden Krankheitsepisoden effektiv ist.

Die Patienten waren schon seit 11 bzw. 16 Jahren erkrankt. Den geringsten Effekt erzielte Immunopure® bei Patient fünf, bei dem die Apherese bei einem akuten Schub eingesetzt wurde und letztlich bei einem CAI von 10 Punkten vor und nach Apheresetherapie keinen Erfolg zeigte. Bei diesem Patienten wurde die Diagnose der Colitis ulcerosa erst ein Jahr zuvor gestellt. Ein akuter Verlauf könnte demnach eine höhere Therapiefrequenz bedingen. Takayama et al. zeigten bestätigend in einer Metaanalyse mit 114 Patienten, die entweder mit LCAP oder GMA behandelt wurden, dass der Therapieerfolg mit einem jüngeren Patientenalter, einem längeren Krankheitsverlauf und einer möglichst frühzeitigen Einsatz der Therapie assoziiert ist [231]. Die Ergebnisse der Anwendungsbeobachtungen bestätigen diese Beobachtung vor allem in Bezug auf die Krankheitsdauer. Patienten im ersten Schub der Erkrankung sowie steroidnaive Patienten profitieren ebenfalls häufig von der Apherese [158].

Des Weiteren war die Rate an Operationen und Rückfällen signifikant niedriger bei Patienten, die auf die Zytapherese ansprachen. Prinzipiell haben dabei Patienten, die auf eine erste Apheresetherapie gut ansprechen, eine höhere Chance, auch auf eine weitere Therapie gut anzusprechen, selbst wenn der klinische Zustand verschlechtert ist [231].

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigen andere Studien, dass der Erfolg der Apherese bei Patienten mit einer kurzen Krankheitsdauer am erfolgreichsten war [232, 158]. Patienten mit einer schwachen Krankheitsaktivität, tiefen Mukosaläsionen, einem erheblichen Verlust intestinalen Gewebes und einer Therapierefraktivität gegenüber der bisherigen medikamentösen Therapie profitieren meist weniger von der Apherese [158]. Dies lässt darauf schließen, dass die Apherese nicht unreflektiert, sondern bei einem ausgewählten Patientenkollektiv erfolgen und hierbei individuell auf die Krankheitsverläufe eingestellt werden sollte. Auch die optimale Therapiefrequenz ist aktuell noch Gegenstand intensiver Diskussionen. Ein Standardtherapieschema skizziert eine Frequenz von einer Therapie pro Woche über 60 Minuten und über einen Zeitraum von fünf Wochen. Ein klinisches Ansprechen wird oft schon nach drei Aphereseeinheiten generiert, eine klinische Remission nach sechs Einheiten [167].

Prinzipiell sollte je nach Krankheitsverlauf und Gesundheitszustand eine angepasste Therapie-Frequenz angewandt werden. Hanai und Mitarbeiter fanden heraus, dass steroid-naive Patienten besser auf fünf Behandlungen reagierten, während steroid-refraktäre Patienten besser auf zehn Behandlungen reagierten [154]. Vor allem zu Beginn eines akuten Schubes oder bei akuten Verläufen bietet sich eine intensivierte Therapieform an, da auch ein frühzeitiges Erreichen einer Remission mit einem längeren Erhalt dieser verbunden ist [233]. Sakuraba und Mitarbeiter [234] konnten darstellen, dass eine intensivere GMA-Apherese mit zwei Therapieeinheiten pro Woche die Remission in einer kürzeren Zeit und signifikant höheren Rate induziert. Sogar eine Therapieform mit einer täglichen Therapieeinheit über fünf Tage wurde mit positiven Ergebnissen erprobt

[235]. Die Verlängerung der Apheresedauer von 60 auf 90 Minuten sowie ein größeres therapiertes Blutvolumen scheinen ebenfalls mit einer erhöhten Remissionsrate assoziiert zu sein [172, 236]. Eine mögliche klinische Umsetzung dieser Ergebnisse könnte in einer zu Therapiebeginn intensivierten Therapieform in den ersten zwei bis drei Wochen und einer nachfolgend gemilderten Apheresefrequenz sein. Zur besseren Beurteilung sollten Dosisfindungsstudien in Bezug auf die Frequenz sowie bzgl. der Langzeitwirkung der Aphereseform - auch in Bezug auf die Kostenwirksamkeit anvisiert werden. Um ein möglichst effektives Therapieregime für jeden Patienten zu generieren, wäre es wünschenswert, diejenigen Patienten prätherapeutisch zu erkennen, bei denen die Therapie wirksam ist. Hier wäre die Evaluierung einfach anwendbarer prädiktiver Parameter äußerst hilfreich [237]. Da Daten zu solch positiv prädiktiven Parametern sehr rar sind, könnten zukünftige Studien die Erhebung eines Scores zum Auftrag haben. Teil dieses Scores könnten u.a. der klinische Aktivitätsindex nach Rachmilewitz zur Darstellung des Schweregrades der Erkrankung [78], genetische und epigenetische Komponenten sowie der Calprotectin-Wert, als Surrogatparameter der entzündlichen Aktivität des Darms, beinhalten [237]. Costa und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass Patienten bei einem fäkalen Calprotectin-Wert $> 150 \text{ } \mu\text{g/g}$ ein 14-fach erhöhtes Risiko haben, innerhalb des nächsten Jahres einen Schub zu erleiden [238]. Auch die Thrombozytenanzahl könnte in diesen Score einfließen. Takemoto konnte darstellen, dass die Effizienz einer Apherese mit der Abnahme der Thrombozytenanzahl korreliert [204]. Ebenfalls sollte eine endoskopische Untersuchung erfolgen. Patienten mit ausgedehnten Ulcera und einem deutlichen Verlust des mukosalen Gewebes profitieren weniger von einer Apherese [158]. Da, wie schon erläutert, steroidnaive Patienten besser auf Apherese reagieren, sollte auch die bisherige Medikation und Therapiehistorie Teil eines Scores sein. Da therapierbare Patienten bereits nach drei Wochen auf die Therapie ansprechen, ist dies ein guter Zeitpunkt für eine Evaluierung der Apheresetherapie. Takemoto konnte in einer Studie als einzigen prädiktiven Faktor ein klinisches Ansprechen nach drei Behandlungen feststellen [204]. Durch einen solchen Score könnten scheiternde Therapieversuche und Unkosten vermieden werden.

Um die Apherese zu einer möglichst effektiven Therapieoption zu machen, sollte das Verfahren in multiple Punkte der Pathogenese eingreifen. Neben den schon anvisierten Targetzellen könnten verbesserte Apherese-Verfahren auch Mikropartikel, sP-Selektin und CD40-Liganden und Aspekte der Epigenetik beeinflussen. Immunopure® konnte sowohl bei den Mikropartikeln, sP-Selektin als auch der CD40-Liganden keine eliminierende Wirkung erzielen. Die gute Wirkung auf Thrombozyten und weitere Target-Zellen wie Monozyten bei einer guten Remissionsinduktion sind Argumente für den Einsatz bei CED-Patienten – v.a. bei Patienten mit einer hohen Thrombozytenzahl und Koagulationsproblemen.

VI Schlussfolgerung

Die Behandlung der Colitis ulcerosa stellt für Ärzte und Patienten stets eine Herausforderung dar. Jeder sollte dabei die für ihn und seinen Krankheitsverlauf bestmögliche Therapie erhalten.

In der multifaktoriellen Pathogenese der Erkrankung spielen sowohl die Kolonmukosa, aufgrund eines gestörten Verhältnisses zwischen zellulären Entzündungsvorgängen und der überschießenden Immunantwort, sowie die erhöhte Konzentration an zirkulierenden und mukosabehafteten Entzündungszellen eine wichtige Rolle. Diese komplexe Pathogenese als auch das äußerst variable klinische Bild mit extraintestinalen Manifestationen und das breite Therapieangebot, mit jeweils unterschiedlichen Nebenwirkungen, machen die Diagnose und Therapie der Colitis ulcerosa zu einer diffizilen Aufgabe. Die Zytapherese stellt hier eine im deutschen Raum bisher vernachlässigte Therapieoption für Ärzte und Patienten dar. Die Behandlungen mit Immunopure® zeigte in dieser und in vorhergehenden unkontrollierten Studien gute Ergebnisse, verbunden mit einem sehr guten Sicherheits- und Nebenwirkungsprofil. So profitierten in dieser Anwendungsbeobachtung 83% der Patienten von der Therapie, 67% gingen in Remission. Die durchschnittliche Verbesserung des klinischen Aktivitätsindex von Rachmilewitz betrug 5,3 Punkte. Es traten keine unerwünschten Ereignisse oder Nebenwirkungen auf. Die technische Durchführbarkeit lag bei 100%.

Letztlich muss das Immunopure®-Verfahren überzeugen und die Frage beantworten, wieso es neben drei bisher auf dem Markt erhältlichen Systemen ein vierter Apheresesystem benötigt. Neben der Adsorption von Entzündungszellen wie Monozyten und Granulozyten ist Immunopure® zusätzlich in der Lage, Thrombozyten und Thrombozytenaggregate zu entfernen. Da Forschungsdaten einen Zusammenhang zwischen der Colitis ulcerosa und Thrombozyten postulieren, sollte dessen Eliminierung mehr Beachtung geschenkt werden. So konnten mehrere Studien die Korrelation zwischen dem Schweregrad der Colitis ulcerosa und der Blutkonzentration von abnormalen Thrombozyten darstellen. Auffällig in der Auswertung der Ergebnisse war, dass die Apherese bei den Patienten 2 und 4, die besonders von der Therapie profitiert haben, die Thrombozytenzahl am stärksten reduzieren konnte. Die Thrombozytenkonzentration konnte während der Apherese auf durchschnittlich 32,5% des Startwertes reduziert werden. Diese *in vivo* in einer Anwendungsbeobachtung erhobenen Ergebnisse konnten *in vitro* anhand eines Rezirkulationsmodells bestätigt werden.

Des Weiteren adsorbiert Immunopure® verschiedene proinflammatorische Zellen wie CD14+CD16+ Monozyten, CD14+-Monozyten und CD10+-Granulozyten effektiv und wirkt somit multimodaler, als es vergleichbare Verfahren tun.

Diese Arbeit und die Veröffentlichung von Ramlow [1] könnten darauf hinweisen, dass Immunopure® den etablierteren Apheresesystemen überlegen sein kann. Einschränkend müssen jedoch die geringen Probandenzahlen genannt werden, an welchen Immunopure® bisher klinisch eingesetzt wurde. So umfasste die Veröffentlichung von Ramlow nur zehn Patienten, während in dieser Anwendungsbeobachtung sechs Patienten behandelt wurden. Die positiven Ergebnisse an größeren Gruppen zu bestätigen, sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein. Das Aphereseverfahren, als auch die Therapie der Colitis ulcerosa im Allgemeinen, sollte jede Möglichkeit der Intervention in den Pathomechanismus der Erkrankung nutzen. Um hier eine größere Interventionsbreite zu generieren, muss der Pathomechanismus der Colitis ulcerosa final entschlüsselt werden. So ist doch auffallend, dass die Apheresetherapie bei unterschiedlichen Verlaufsformen der Erkrankungen unterschiedlich wirkt.

Es sollte daher Ziel zukünftiger Studien sein zu entschlüsseln, inwieweit diverse Pathomechanismen für unterschiedliche Verlaufsformen verantwortlich sind und wie die Apherese hier eingreifen kann. Solange die Pathogenese der Colitis ulcerosa nicht final verstanden ist und somit keine kurativer Therapieansatz besteht, sollte ein multimodaler Therapieansatz gewählt werden. Hierfür ist die Apherese eine vielversprechende, wenn auch nicht voll elaborierte Therapieoption, die bisher außerhalb Japans zu wenig beachtet wurde. Auf Basis der zugrunde liegenden Daten und der diskutierten sozioökonomischen Begebenheiten sollte der Behandlung mit Apherese mehr Beachtung geschenkt werden. Auch wenn die Apheresetherapie initial teurer erscheint, macht das Sicherheits- und Nebenwirkungsprofil die Apherese zu einem sicheren und kosteneffektiven Verfahren bei Risikopatienten. Den guten klinischen Erfahrungen mit Immunopure® und anderen Aphereseverfahren zum Trotz muss konzediert werden, dass es bisher keine doppelblind-randomisierte Studie gibt, die die Wirkung und Überlegenheit der Apherese oder speziell von Immunopure® bewiesen hat.

Unter Berücksichtigung der genannten Ergebnisse sollte derzeit eine Apherese vor allem bei Risikopatienten wie bspw. Kindern oder Schwangeren in Betracht gezogen werden. Auch bei Patienten, die aufgrund von Nebenwirkungen, Intoleranz oder Wirkungslosigkeit von einer medikamentösen Therapie nicht oder nicht ausreichend profitieren, könnte die Apherese eine nützliche Behandlungsoption darstellen. Bei Patienten, bei denen die Apherese besonders erfolgsversprechend ist (jüngeres Patientenalter, kurzer oder intermittierender Krankheitsverlauf, Steroidnaivität) wäre wie in Japan ein möglichst frühzeitiger Einsatz in einem Therapiekonzept denkbar. Die Apherese mit Immunopure® sollte in diesem Rahmen v.a. bei Patienten mit erhöhten Thrombozytenzahlen und / oder Koagulationsproblemen gewählt werden.

Literatuverzeichnis

1. Ramlow W, Waitz G, Sparmann G, Prophet H, Bodammer P, Emmrich J. First human application of a novel adsorptive-type cytapheresis module in patients with active ulcerative colitis: a pilot study. *Ther Apher Dial.* 2013;17:339–47. doi:10.1111/1744-9987.12007.
2. Conrad S, Hüppe A, Raspe H. Zu welchen Themen wünschen Patientinnen und Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa mehr Informationen und welche eigene Rolle bevorzugen sie bei medizinischen Behandlungssentscheidungen? Ergebnisse einer Betroffenenbefragung in Deutschland. *Z Gastroenterol.* 2012;50:364–72. doi:10.1055/s-0031-1281949.
3. Khanna R, Feagan BG. Emerging Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis.* 2016;34 Suppl 1:67–73. doi:10.1159/000447378.
4. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* 2012;142:46. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001.
5. Hein R, Köster I, Bollschweiler E, Schubert I. Prevalence of inflammatory bowel disease: estimates for 2010 and trends in Germany from a large insurance-based regional cohort. *Scand J Gastroenterol.* 2014;49:1325–35. doi:10.3109/00365521.2014.962605.
6. Timmer A, Goebell H. Incidence of ulcerative colitis, 1980–1995—a prospective study in an urban population in Germany. *Z Gastroenterol.* 1999;37:1079–84.
7. Ott C, Obermeier F, Thieler S, Kemptner D, Bauer A, Schölmerich J, et al. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008;20:917–23. doi:10.1097/MEG.0b013e3282f97b33.
8. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2015;50:942–51. doi:10.3109/00365521.2015.1014407.
9. Blanchard JF, Bernstein CN, Wajda A, Rawsthorne P. Small-area variations and sociodemographic correlates the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Epidemiol.* 2001;154:328–35.
10. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis.* 2017;11:649–70. doi:10.1093/ecco-jcc/jjx008.
11. Dignass A. Aktualisierte Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa 2011 Ergebnisse einer Evidenzbasierten Konsensuskonferenz; 2011.
12. Stange EF, Travis SPL, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis.* 2008;2:1–23. doi:10.1016/j.crohns.2007.11.001.
13. Travis SPL, Stange EF, Lémann M, Oresland T, Bemelman WA, Chowers Y, et al. European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Current management. *J Crohns Colitis.* 2008;2:24–62. doi:10.1016/j.crohns.2007.11.002.
14. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet.* 2012;380:1606–19. doi:10.1016/S0140-6736(12)60150-0.
15. Ford AC, Moayyedi P, Hanauer SB. Ulcerative colitis. *BMJ.* 2013;346:f432. doi:10.1136/bmj.f432.
16. Stark R, König H-H, Leidl R. Costs of inflammatory bowel disease in Germany. *Pharmacoeconomics.* 2006;24:797–814.
17. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev.* 2014;13:3–10. doi:10.1016/j.autrev.2013.06.004.
18. Pullan RD, Thomas GA, Rhodes M, Newcombe RG, Williams GT, Allen A, Rhodes J. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut.* 1994;35:353–9.
19. Biancone L, Michetti P, Travis S, Escher JC, Moser G, Forbes A, et al. European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Special situations. *J Crohns Colitis.* 2008;2:63–92. doi:10.1016/j.crohns.2007.12.001.
20. García Rodríguez LA, Ruigómez A, Panés J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2006;130:1588–94. doi:10.1053/j.gastro.2006.02.004.

21. Porter CK, Tribble DR, Aliaga PA, Halvorson HA, Riddle MS. Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008;135:781–6. doi:10.1053/j.gastro.2008.05.081.
22. Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol*. 2006;16:181–8. doi:10.1016/j.tcb.2006.02.006.
23. Wehkamp J, Gotz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory Bowel Disease. *Dtsch Arztbl Int*. 2016;113:72–82. doi:10.3238/arztbl.2016.0072.
24. Landy J, Ronde E, English N, Clark SK, Hart AL, Knight SC, et al. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22:3117–26. doi:10.3748/wjg.v22.i11.3117.
25. Grit Waitz, Heinrich Prophet and Wolfgang Ramlow. New White Blood Cell Adsorbent: Immunopure.
26. Loftus EV, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Mahoney DW, Zinsmeister AR, Offord KP, Melton LJ. Primary sclerosing cholangitis is associated with nonsmoking: a case-control study. *Gastroenterology*. 1996;110:1496–502.
27. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126:1504–17.
28. Birrenbach T, Böcker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10:848–59.
29. Martin TD, Chan SSM, Hart AR. Environmental factors in the relapse and recurrence of inflammatory bowel disease: a review of the literature. *Dig Dis Sci*. 2015;60:1396–405. doi:10.1007/s10620-014-3437-3.
30. Shah ND, Parian AM, Mullin GE, Limketkai BN. Oral Diets and Nutrition Support for Inflammatory Bowel Disease: What Is the Evidence? *Nutr Clin Pract*. 2015;30:462–73. doi:10.1177/0884533615591059.
31. Lee D, Albenberg L, Compher C, Baldassano R, Piccoli D, Lewis JD, Wu GD. Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2015;148:1087–106. doi:10.1053/j.gastro.2015.01.007.
32. Khalili H. Risk of Inflammatory Bowel Disease with Oral Contraceptives and Menopausal Hormone Therapy: Current Evidence and Future Directions. *Drug Saf* 2015. doi:10.1007/s40264-015-0372-y.
33. Probert CS, Jayanthi V, Hughes AO, Thompson JR, Wicks AC, Mayberry JF. Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire. *Gut*. 1993;34:1547–51.
34. McCole DF. IBD candidate genes and intestinal barrier regulation. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20:1829–49. doi:10.1097/MIB.0000000000000090.
35. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*. 2011;43:246–52. doi:10.1038/ng.764.
36. Spekhorst LM, Visschedijk MC, Weersma RK, Festen EA. Down the line from genome-wide association studies in inflammatory bowel disease: the resulting clinical benefits and the outlook for the future. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11:33–44. doi:10.1586/1744666X.2015.990439.
37. Barrett JC, Lee JC, Lees CW, Prescott NJ, Anderson CA, Phillips A, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet*. 2009;41:1330–4. doi:10.1038/ng.483.
38. Cutler DJ, Zwick ME, Okou DT, Prahalad S, Walters T, Guthery SL, et al. Dissecting Allele Architecture of Early Onset IBD Using High-Density Genotyping. *PLoS ONE*. 2015;10:e0128074. doi:10.1371/journal.pone.0128074.
39. Al-Meghaiseeb ES, Al-Otaibi MM, Al-Robayan A, Al-Amro R, Al-Malki AS, Arfin M, Al-Asmari AK. Genetic association of apolipoprotein E polymorphisms with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2015;21:897–904. doi:10.3748/wjg.v21.i3.897.
40. Connelly TM, Berg AS, Harris L, Brinton D, Deiling S, Koltun WA. Genetic determinants associated with early age of diagnosis of IBD. *Dis Colon Rectum*. 2015;58:321–7. doi:10.1097/DCR.0000000000000274.

41. Hayes P, Dhillon S, O'Neill K, Thoeni C, Hui KY, Elkadri A, et al. Defects in NADPH Oxidase Genes NOX1 and DUOX2 in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2015;1:489–502. doi:10.1016/j.jcmgh.2015.06.005.
42. Gazouli M. Circulating microRNAs in Inflammatory Bowel Diseases. *EXS.* 2015;106:197–214. doi:10.1007/978-3-0348-0955-9_9.
43. Schaefer JS, Attumi T, Opekun AR, Abraham B, Hou J, Shelby H, et al. MicroRNA signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis. *BMC Immunol.* 2015;16:5. doi:10.1186/s12865-015-0069-0.
44. Dalal SR, Kwon JH. The Role of MicroRNA in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2010;6:714–22.
45. López-Serrano P, Pérez-Calle JL, Pérez-Fernández MT, Fernández-Font JM, Boixeda de Miguel D, Fernández-Rodríguez CM. Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45:1464–71. doi:10.3109/00365521.2010.510575.
46. Gudrun Heyn. Sensible Festung gegen Angreifer: Immunsystem im Darm. *Pharmazeutische Zeitung online.*
47. Ekbom A. Inflammatory bowel disease: Occurrence, causation and cancer risk. *Uppsala, Stockholm;* 1990.
48. Forrest K, Symmons D, Foster P. Systematic review: is ingestion of paracetamol or non-steroidal anti-inflammatory drugs associated with exacerbations of inflammatory bowel disease? *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20:1035–43. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02270.x.
49. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology.* 2005;129:550–64. doi:10.1016/j.gastro.2005.05.002.
50. Ebrahimi Daryani N, Saghazadeh A, Moossavi S, Sadr M, Shahkarami S, Soltani S, et al. Interleukin-4 and Interleukin-10 Gene Polymorphisms in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Immunol Invest.* 2017;46:714–29. doi:10.1080/08820139.2017.1360343.
51. Matusiewicz M, Neubauer K, Bednarz-Misa I, Gorska S, Krzystek-Korpacka M. Systemic interleukin-9 in inflammatory bowel disease: Association with mucosal healing in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2017;23:4039–46. doi:10.3748/wjg.v23.i22.4039.
52. Katsanos KH, Papadakis KA. Inflammatory Bowel Disease: Updates on Molecular Targets for Biologics. *Gut Liver.* 2017;11:455–63. doi:10.5009/gnl16308.
53. A D Harries. Platelet count: a simple measure of activity in Crohn's disease.; 1983-05-07.
54. Alkim H, Ayaz S, Alkim C, Ulker A, Sahin B. Continuous active state of coagulation system in patients with nonthrombotic inflammatory bowel disease. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2011;17:600–4. doi:10.1177/1076029611405034.
55. Collins CE, Rampton DS, Rogers J, Williams NS. Platelet aggregation and neutrophil sequestration in the mesenteric circulation in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1997;9:1213–7.
56. Kayo S, Ikura Y, Suekane T, Shirai N, Sugama Y, Ohsawa M, et al. Close association between activated platelets and neutrophils in the active phase of ulcerative colitis in humans. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:727–35.
57. Andoh A, Yoshida T, Yagi Y, Bamba S, Hata K, Tsujikawa T, et al. Increased aggregation response of platelets in patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2006;41:47–54. doi:10.1007/s00535-005-1721-x.
58. Deban L, Correale C, Vetrano S, Malesci A, Danese S. Multiple pathogenic roles of microvasculature in inflammatory bowel disease: a Jack of all trades. *Am J Pathol.* 2008;172:1457–66. doi:10.2353/ajpath.2008.070593.
59. Giannotta M. Thrombosis in inflammatory bowel diseases: what's the link?: BioMed Central; 2015-04-02.
60. Voudoukis E, Karmiris K, Koutroubakis IE. Multipotent role of platelets in inflammatory bowel diseases: a clinical approach. *World J Gastroenterol.* 2014;20:3180–90. doi:10.3748/wjg.v20.i12.3180.

61. Voudoukis E, Karmiris K, Oustamanolakis P, Theodoropoulou A, Sfiridaki A, Paspatis GA, Koutroubakis IE. Association between thrombocytosis and iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2013;25:1212–6. doi:10.1097/MEG.0b013e328363e354.
62. Kulnigg-Dabsch S, Evstatiev R, Dejaco C, Gasche C. Effect of iron therapy on platelet counts in patients with inflammatory bowel disease-associated anemia. *PLoS ONE.* 2012;7:e34520. doi:10.1371/journal.pone.0034520.
63. Burnouf T, Goubran HA, Chou M-L, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev.* 2014;28:155–66. doi:10.1016/j.blre.2014.04.002.
64. Andoh A, Tsujikawa T, Hata K, Araki Y, Kitoh K, Sasaki M, et al. Elevated circulating platelet-derived microparticles in patients with active inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:2042–8. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.50381.x.
65. Deutschmann A, Schlagenhauf A, Leschnik B, Hoffmann KM, Hauer A, Muntean W. Increased procoagulant function of microparticles in pediatric inflammatory bowel disease: role in increased thrombin generation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;56:401–7. doi:10.1097/MPG.0b013e31827daf72.
66. Kappelman MD, Horvath-Puho E, Sandler RS, Rubin DT, Ullman TA, Pedersen L, et al. Thromboembolic risk among Danish children and adults with inflammatory bowel diseases: a population-based nationwide study. *Gut.* 2011;60:937–43. doi:10.1136/gut.2010.228585.
67. Ajdukovic J, Salamunic I, Hozo I, Despalatovic BR, Simunic M, Bonacic D, et al. Soluble P-selectin glycoprotein ligand - a possible new target in ulcerative colitis. *Bratisl Lek Listy.* 2015;116:147–9.
68. Khazen D, Jendoubi-Ayed S, Aleya WB, Sfar I, Mouelhi L, Matri S, et al. Polymorphism in ICAM-1, PECAM-1, E-selectin, and L-selectin genes in Tunisian patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009;21:167–75. doi:10.1097/MEG.0b013e32830e6fc8.
69. Gulubova MV, Manolova IM, Vlaykova TI, Prodanova M, Jovchev JP. Adhesion molecules in chronic ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22:581–9. doi:10.1007/s00384-006-0236-0.
70. Danese S, Katz JA, Saibeni S, Papa A, Gasbarrini A, Vecchi M, Fiocchi C. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients. *Gut.* 2003;52:1435–41.
71. Ludwiczek O, Kaser A, Tilg H. Plasma levels of soluble CD40 ligand are elevated in inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18:142–7. doi:10.1007/s00384-002-0425-4.
72. Polese L, Angriman I, Cecchetto A, Norberto L, Scarpa M, Ruffolo C, et al. The role of CD40 in ulcerative colitis: histochemical analysis and clinical correlation. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002;14:237–41.
73. Danese S. Inflammation and the mucosal microcirculation in inflammatory bowel disease: The ebb and flow. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;23:384–9. doi:10.1097/COG.0b013e32810c8de3.
74. Liu Z, Colpaert S, D'Haens GR, Kasran A, Boer M de, Rutgeerts P, et al. Hyperexpression of CD40 ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production. *J Immunol.* 1999;163:4049–57.
75. Herold et al. 2014
76. Anton J, Kroesen BK. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Handbuch für Klinik und Praxis.
77. Roth L S. Predictors of disease severity in ulcerative colitis patients from Southwestern Ontario: Baishideng; 2010-01-14.
78. Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial.
79. Vavricka SR, Schoepfer A, Scharl M, Lakatos PL, Navarini A, Rogler G. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21:1982–92. doi:10.1097/MIB.0000000000000392.
80. Harbord M, Annese V, Vavricka SR, Allez M, Barreiro-de Acosta M, Borberg K, et al. The First European Evidence-Based Consensus on Extra-Intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* 2015. doi:10.1093/ecco-jcc/jv213.

81. Rossi RE, Conte D, Massironi S. Primary sclerosing cholangitis associated with inflammatory bowel disease: an update. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2016;28:123–31. doi:10.1097/MEG.0000000000000532.
82. Vries AB de, Janse M, Blokzijl H, Weersma RK. Distinctive inflammatory bowel disease phenotype in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol*. 2015;21:1956–71. doi:10.3748/wjg.v21.i6.1956.
83. Veloso FT, Carvalho J, Magro F. Immune-related systemic manifestations of inflammatory bowel disease. A prospective study of 792 patients. *J Clin Gastroenterol*. 1996;23:29–34.
84. Mendes FD, Levy C, Enders FB, Loftus EV, Angulo P, Lindor KD. Abnormal hepatic biochemistries in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:344–50. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00947.x.
85. Razumilava N, Gores GJ, Lindor KD. Cancer surveillance in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 2011;54:1842–52. doi:10.1002/hep.24570.
86. Rasmussen HH, Fonager K, Sørensen HT, Pedersen L, Dahlerup JF, Steffensen FH. Risk of acute pancreatitis in patients with chronic inflammatory bowel disease. A Danish 16-year nationwide follow-up study. *Scand J Gastroenterol*. 1999;34:199–201.
87. Fornaciari G, Salvarani C, Beltrami M, Macchioni P, Stockbrügger RW, Russel MG. Musculoskeletal manifestations in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol*. 2001;15:399–403.
88. Reinshagen M. Osteoporosis in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2008;2:202–7. doi:10.1016/j.crohns.2008.01.005.
89. Larsen S, Bendtzen K, Nielsen OH. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: Epidemiology, diagnosis, and management. *Ann Med*. 2010;42:97–114. doi:10.3109/07853890903559724.
90. Farhi D, Cosnes J, Zizi N, Chosidow O, Seksik P, Beaugerie L, et al. Significance of erythema nodosum and pyoderma gangrenosum in inflammatory bowel diseases: A cohort study of 2402 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2008;87:281–93. doi:10.1097/MD.0b013e318187cc9c.
91. Freeman HJ. Erythema nodosum and pyoderma gangrenosum in 50 patients with Crohn's disease. *Can J Gastroenterol*. 2005;19:603–6.
92. Mahmood S, Nusrat S, Crosby A, Zhao YD, Ali T. Assessment of sexual function among inflammatory bowel disease patients. *Am J Gastroenterol*. 2015;110:601–3. doi:10.1038/ajg.2015.53.
93. Fumery M, Xiaocang C, Dauchet L, Gower-Rousseau C, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Thromboembolic events and cardiovascular mortality in inflammatory bowel diseases: a meta-analysis of observational studies. *J Crohns Colitis*. 2014;8:469–79. doi:10.1016/j.crohns.2013.09.021.
94. Kucharzik et al. Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS).
95. Hollerbach S, Geissler A, Schiegl H, Kullmann F, Lock G, Schmidt J, et al. The accuracy of abdominal ultrasound in assessment of bowel disorders. *Scand J Gastroenterol*. 1998;33:1201–8.
96. Parente F, Greco S, Molteni M, Cucino C, Maconi G, Sampietro GM, et al. Role of early ultrasound in detecting inflammatory intestinal disorders and identifying their anatomical location within the bowel. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;18:1009–16.
97. Maconi G, Ardizzone S, Parente F, Bianchi Porro G. Ultrasonography in the evaluation of extension, activity, and follow-up of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 1999;34:1103–7.
98. Atreya R, Neumann H, Neurath MF. Update: chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Dtsch Med Wochenschr*. 2015;140:1762–72. doi:10.1055/s-0041-106605.
99. Jesuratnam-Nielsen K, Løgager VB, Munkholm P, Thomsen HS. Diagnostic accuracy of three different MRI protocols in patients with inflammatory bowel disease. *Acta Radiol Open*. 2015;4:2058460115588099. doi:10.1177/2058460115588099.
100. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2011;365:1713–25. doi:10.1056/NEJMra1102942.
101. Jauregui-Amezaga A, Geerits A, Das Y, Lemmens B, Sagaert X, Bessisow T, et al. A Simplified Geboes Score for Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis*. 2017;11:305–13. doi:10.1093/ecco-jcc/jjw154.

102. Bressenot A, Salleron J, Bastien C, Danese S, Boulagnon-Rombi C, Peyrin-Biroulet L. Comparing histological activity indexes in UC. *Gut*. 2015;64:1412–8. doi:10.1136/gutjnl-2014-307477.

103. Mosli MH, Feagan BG, Zou G, Sandborn WJ, D'Haens G, Khanna R, et al. Development and validation of a histological index for UC. *Gut* 2015. doi:10.1136/gutjnl-2015-310393.

104. Rodgers AD, Cummins AG. CRP correlates with clinical score in ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2007;52:2063–8. doi:10.1007/s10620-006-9691-2.

105. Sherwood RA. Faecal markers of gastrointestinal inflammation. *J Clin Pathol*. 2012;65:981–5. doi:10.1136/jclinpath-2012-200901.

106. Straumann A, Beglinger C, Schoepfer AM. Ulcerative colitis: Correlation of the Rachmilewitz endoscopic activity index with fecal calprotectin, clinical activity, C-reactive protein, and blood leukocytes.

107. Silverberg MS. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of bowel disease: Report of a working party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. Oakville, ON: Pulsus Group; 2005.

108. Campieri M, Franchis R de, Bianchi Porro G, Ranzi T, Brunetti G, Barbara L. Mesalazine (5-aminosalicylic acid) suppositories in the treatment of ulcerative proctitis or distal proctosigmoiditis. A randomized controlled trial. *Scand J Gastroenterol*. 1990;25:663–8. doi:10.3109/00365529008997590.

109. Brown J, Haines S, Wilding IR. Colonic spread of three rectally administered mesalazine (Pentasa) dosage forms in healthy volunteers as assessed by gamma scintigraphy. *Aliment Pharmacol Ther*. 1997;11:685–91.

110. Jacobsen BA, Abildgaard K, Rasmussen HH, Christensen LA, Fallingborg J, Hansen SH, Rasmussen SN. Availability of mesalazine (5-aminosalicylic acid) from enemas and suppositories during steady-state conditions. *Scand J Gastroenterol*. 1991;26:374–8.

111. Frieri G, Giacomelli R, Pimpo M, Palumbo G, Passacantando A, Pantaleoni G, Caprilli R. Mucosal 5-aminosalicylic acid concentration inversely correlates with severity of colonic inflammation in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2000;47:410–4.

112. Safdi M, DeMicco M, Sninsky C, Banks P, Wruble L, Deren J, et al. A double-blind comparison of oral versus rectal mesalamine versus combination therapy in the treatment of distal ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 1997;92:1867–71.

113. Frieri G, Pimpo M, Galletti B, Palumbo G, Corrao G, Latella G, et al. Long-term oral plus topical mesalazine in frequently relapsing ulcerative colitis. *Dig Liver Dis*. 2005;37:92–6. doi:10.1016/j.dld.2004.09.017.

114. Higgins PDR, Rubin DT, Kaulback K, Schoenfield PS, Kane SV. Systematic review: impact of non-adherence to 5-aminosalicylic acid products on the frequency and cost of ulcerative colitis flares. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;29:247–57. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03865.x.

115. Travis SPL, Danese S, Kupcinskas L, Alexeeva O, D'Haens G, Gibson PR, et al. Once-daily budesonide MMX in active, mild-to-moderate ulcerative colitis: results from the randomised CORE II study. *Gut*. 2014;63:433–41. doi:10.1136/gutjnl-2012-304258.

116. Lindgren SC, Flood LM, Kilander AF, Löfberg R, Persson TB, Sjödahl RI. Early predictors of glucocorticosteroid treatment failure in severe and moderately severe attacks of ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1998;10:831–5.

117. Jan Wehkamp. Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen

118. Schreiber S. Vedolizumab bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn: eine Standortbestimmung: Georg Thieme Verlag; 2015-06.

119. Bye WA, Jairath V, Travis SPL. Systematic review: The safety of vedolizumab for the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46:3–15. doi:10.1111/apt.14075.

120. Turner D, Walsh CM, Steinhart AH, Griffiths AM. Response to corticosteroids in severe ulcerative colitis: a systematic review of the literature and a meta-regression. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:103–10. doi:10.1016/j.cgh.2006.09.033.

121. Lennard-Jones JE. Assessment of severity in colitis: a preliminary study; 1975-08.

122. Lichtenstein GR, Cohen R, Yamashita B, Diamond RH. Quality of life after proctocolectomy with ileoanal anastomosis for patients with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40:669–77.

123. Heuschen UA, Heuschen G, Rudek B, Hinz U, Stern J, Herfarth C. Lebensqualität im Langzeitverlauf nach kontinenzerhaltender Proktocolectomie wegen Colitis ulcerosa und familiärer adenomatöser Polyposis. *Chirurg*. 1998;69:1052–8.

124. Bewtra M, Newcomb CW, Wu Q, Chen L, Xie F, Roy JA, et al. Mortality associated with medical therapy versus elective colectomy in ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med*. 2015;163:262–70. doi:10.7326/M14-0960.

125. Jeuring SFG, Bours PHA, Zeegers MP, Amberg TW, van den Heuvel, Tim R A, Romberg-Camps MJL, et al. Disease Outcome of Ulcerative Colitis in an Era of Changing Treatment Strategies: Results from the Dutch Population-Based IBDSDL Cohort. *J Crohns Colitis*. 2015;9:837–45. doi:10.1093/ecco-jcc/jjv129.

126. Gardenbroek TJ, Eshuis EJ, Ponsioen CIJ, Ubbink DT, D'Haens, G R A M, Bemelman WA. The effect of appendectomy on the course of ulcerative colitis: a systematic review. *Colorectal Dis*. 2012;14:545–53. doi:10.1111/j.1463-1318.2011.02600.x.

127. Lee H-S, Park SH, Yang S-K, Kim S-O, Soh JS, Lee S, et al. Appendectomy and the clinical course of ulcerative colitis: a retrospective cohort study and a nested case-control study from Korea. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30:470–7. doi:10.1111/jgh.12707.

128. Grinspan AM, Kelly CR. Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis: Not Just Yet. *Gastroenterology*. 2015;149:15–8. doi:10.1053/j.gastro.2015.05.030.

129. Narula N, Kassam Z, Yuan Y, Colombel J-F, Ponsioen C, Reinisch W, Moayyedi P. Systematic Review and Meta-analysis: Fecal Microbiota Transplantation for Treatment of Active Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2017. doi:10.1097/MIB.0000000000001228.

130. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology*. 1994;107:3–11.

131. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Colorectal cancer risk and mortality in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1992;103:1444–51.

132. Faubion WA, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology*. 2001;121:255–60.

133. Toruner M, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Orenstein R, Sandborn WJ, et al. Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008;134:929–36. doi:10.1053/j.gastro.2008.01.012.

134. Cúrdia Gonçalves T. Impact of the age of diagnosis on the natural history of ulcerative colitis. *Rev Esp Enferm Dig* 2015. doi:10.17235/reed.2015.3736/2015.

135. Bitton A, Vutcovici M, Sewitch M, Suissa S, Brassard P. Mortality Trends in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: A Population-based Study in Québec, Canada. *Inflamm Bowel Dis* 2016. doi:10.1097/MIB.000000000000608.

136. Jakobovits SL, Travis SPL. Management of acute severe colitis. *Br Med Bull*. 2005;75-76:131–44. doi:10.1093/bmb/ldl001.

137. Kreis M. Notfälle und letale Verläufe gibt es nur noch selten. Enorme Fortschritte bei Colitis ulcerosa. *MMW Fortschr Med*. 2015;157:44.

138. Desai D, Shah S, Deshmukh A, Abraham P, Joshi A, Gupta T, et al. Colorectal cancers in ulcerative colitis from a low-prevalence area for colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2015;21:3644–9. doi:10.3748/wjg.v21.i12.3644.

139. D'Ovidio V, Meo D, Gozer M, Bazuro ME, Vernia P. Ulcerative colitis and granulocyte-monocyte - apheresis: Safety and efficacy of maintenance therapy during pregnancy. *J Clin Apher*. 2015;30:55–7. doi:10.1002/jca.21349.

140. Ruuska T, Küster P, Grahnquist L, Lindgren F, Wewer AV. Efficacy and safety of granulocyte, monocyte/macrophage adsorptive in pediatric ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2016;22:4389–96. doi:10.3748/wjg.v22.i17.4389.

141. van Kruiningen HJ, Joossens M, Vermeire S, Joossens S, Debeugny S, Gower-Rousseau C, et al. Environmental factors in familial Crohn's disease in Belgium. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11:360–5.

142. Kashiwagi N, Sugimura K, Koiwai H, Yamamoto H, Yoshikawa T, Saniabadi AR, 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.

143. Sigurbjörnsson FT, Bjarnason I. Leukocytapheresis for the treatment of IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2008;5:509–16. doi:10.1038/ncpgasthep1209.

144. Ramlow W, Emmrich J, Ahrenholz P, Sparmann G, Kashiwagi N, Franz M, et al. In vitro and in vivo evaluation of Adacolumn cytapheresis in healthy subjects. *J Clin Apher.* 2005;20:72–80. doi:10.1002/jca.20053.

145. Shibata H, Kuriyama T, Yamawaki N. Cellsorba. *Ther Apher Dial.* 2003;7:44–7.

146. ASAHI KASEI MEDICAL CO. Cellsorba - Leukocyte removal for M. Crohn and Colitis ulcerosa.

147. Danese S, Angelucci E, Stefanelli T, Omodei P, Luigiano C, Finazzi S, et al. Cytapheresis in inflammatory bowel diseases: current evidence and perspectives. *Digestion.* 2008;77:96–107. doi:10.1159/000122473.

148. Yokoyama Y, Matsuoka K, Kobayashi T, Sawada K, Fujiyoshi T, Ando T, et al. A large-scale, prospective, observational study of leukocytapheresis for ulcerative colitis: treatment outcomes of 847 patients in clinical practice. *J Crohns Colitis.* 2014;8:981–91. doi:10.1016/j.crohns.2014.01.027.

149. Sawada K, Kusugami K, Suzuki Y, Bamba T, Munakata A, Hibi T, Shimoyama T. 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. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.41089.x.

150. Saniabadi AR, Hanai H, Takeuchi K, Umemura K, Nakashima M, Adachi T, et al. Adacolumn, an adsorptive carrier based granulocyte and monocyte apheresis device for the treatment of inflammatory and refractory diseases associated with leukocytes. *Ther Apher Dial.* 2003;7:48–59.

151. Leitner G, Worel N, Vogelsang H. Selective Granulocyte and Monocyte Apheresis as a Non-Pharmacological Option for Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Transfus Med Hemother.* 2012;39:246–52.

152. Hanai H, Takeda Y, Eberhardson M, Gruber R, Saniabadi AR, Winqvist O, Lofberg R. The mode of actions of the Adacolumn therapeutic leucocytapheresis in patients with inflammatory bowel disease: a concise review. *Clin Exp Immunol.* 2011;163:50–8. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04279.x.

153. 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. doi:10.1007/s10620-007-0168-8.

154. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Kageoka M, 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. doi:10.1016/j.dld.2008.01.007.

155. Yokoyama Y, Fukunaga K, Fukuda Y, Tozawa K, Kamikozuru K, Ohnishi K, 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. doi:10.1007/s10620-006-9560-z.

156. Shimoyama T, Sawada K, Hiwatashi N, Sawada T, Matsueda K, Munakata A, et al. Safety and efficacy of granulocyte and monocyte adsorption apheresis in patients with active ulcerative colitis: a multicenter study. *J Clin Apher.* 2001;16:1–9.

157. Bresci G, Parisi G, Mazzoni A, Scatena F, Capria A. Granulocytapheresis versus methylprednisolone in patients with acute ulcerative colitis: 12-month follow up. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:1678–82. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05595.x.

158. Saniabadi AR, Tanaka T, Ohmori T, Sawada K, Yamamoto T, Hanai H. Treating inflammatory bowel disease by adsorptive leucocytapheresis: a desire to treat without drugs. *World J Gastroenterol.* 2014;20:9699–715. doi:10.3748/wjg.v20.i29.9699.

159. Sands BE, Sandborn WJ, Feagan B, Löfberg R, Hibi T, Wang T, et al. A randomized, double-blind, sham-controlled study of granulocyte/monocyte apheresis for active ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2008;135:400–9. doi:10.1053/j.gastro.2008.04.023.

160. BioArt Products GmbH. Immuloc.

161. Schultheiß C, Weischenberg R, Herrmann A, Haller B, Schmid RM, Reindl W, Huber W. Dose-intensified granulocyte-monocyte apheresis in therapy refractory ulcerative colitis. *Artif Organs.* 2015;39:187–92. doi:10.1111/aor.12329.

162. Igoshi T, Tomisawa N, Hori Y, Jinbo Y. Polyester polymer alloy as a high-performance membrane. *Contrib Nephrol.* 2011;173:148–55. doi:10.1159/000329053.

163. Kruis W, Nguyen P, Morgenstern J, Ramlow W, Dignaß A, Stallmach A, Drebber U. Novel Leucocyte/Thrombocyte Apheresis for Induction of Steroid-Free Remission in Ulcerative Colitis: A Controlled Randomized Pilot Study. *J Crohns Colitis.* 2019;13:949–53. doi:10.1093/ecco-jcc/jjz005.

164. Tiburtius M. Eine prospektive Pilotstudie zur Beurteilung der Sicherheit, Verträglichkeit und Effektivität eines neuen adsorptiven Apheresesystems (ATCAD) bei Patienten mit mäßiger bis schwerer, chronisch aktiver Colitis ulcerosa [Dissertation]. Rostock: Universität Rostock; 2012.

165. Sawada K, Ohnishi K, Kosaka T, Chikano S, Yokota Y, Egashira A, et al. Leukocytapheresis with leukocyte removal filter as new therapy for ulcerative colitis. *Ther Apher.* 1997;1:207–11.

166. Hanai H, Watanabe F, Takeuchi K, Iida T, Yamada M, Iwaoka Y, et al. Leukocyte adsorptive apheresis for the treatment of active ulcerative colitis: A prospective, uncontrolled, pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2003;1:28–35. doi:10.1053/jcgh.2003.50005.

167. Suzuki Y, Yoshimura N, Saniabadi AR, Saito Y. Selective granulocyte and monocyte adsorptive apheresis as a first-line treatment for steroid naïve patients with active ulcerative colitis: a prospective uncontrolled study. *Dig Dis Sci.* 2004;49:565–71.

168. Naganuma M, Funakoshi S, Sakuraba A, Takagi H, Inoue N, Ogata H, et al. Granulocytapheresis is useful as an alternative therapy in patients with steroid-refractory or -dependent ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:251–7. doi:10.1097/00054725-200405000-00012.

169. Hanai H, Watanabe F, Yamada M, Sato Y, Takeuchi K, Iida T, et al. Adsorptive granulocyte and monocyte apheresis versus prednisolone in patients with corticosteroid-dependent moderately severe ulcerative colitis. *Digestion.* 2004;70:36–44. doi:10.1159/000080079.

170. Yamamoto T, Umegae S, Kitagawa T, Yasuda Y, Yamada Y, Takahashi D, et al. Granulocyte and monocyte adsorptive apheresis in the treatment of active distal ulcerative colitis: A prospective, pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20:783–92. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02189.x.

171. Domènech E, Hinojosa J, Esteve-Comas M, Gomollón F, Herrera JM, Bastida G, et al. Granulocyteapheresis in steroid-dependent inflammatory bowel disease: A prospective, open, pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20:1347–52. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02288.x.

172. Kanke K, Nakano M, Hiraishi H, Terano A. Clinical evaluation of granulocyte/monocyte apheresis therapy for active ulcerative colitis. *Dig Liver Dis.* 2004;36:811–7. doi:10.1016/j.dld.2004.08.004.

173. Kim HJ, Kim JS, Han DS, Yang S-K, Hahm KB, Lee WI, et al. Granulocyte and monocyte adsorption apheresis in Korean conventional treatment-refractory patients with active ulcerative colitis: A prospective open-label multicenter study. *Korean J Gastroenterol.* 2005;45:34–44.

174. Kruis W, Dignass A, Steinhagen-Thiessen E, Morgenstern J, Mössner J, Schreiber S, et al. Open label trial of granulocyte apheresis suggests therapeutic efficacy in chronically active steroid refractory ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2005;11:7001–6. doi:10.3748/wjg.v11.i44.7001.

175. D’Ovidio V, Aratari A, Viscido A, Marcheggiano A, Papi C, Capurso L, Caprilli R. Mucosal features and granulocyte-monocyte-apheresis in steroid-dependent/refractory ulcerative colitis. *Dig Liver Dis.* 2006;38:389–94. doi:10.1016/j.dld.2005.12.005.

176. Giampaolo B, Giuseppe P, Michele B, Alessandro M, Fabrizio S, Alfonso C. Treatment of active steroid-refractory inflammatory bowel diseases with granulocytapheresis: Our experience with a prospective study. *World J Gastroenterol.* 2006;12:2201–4. doi:10.3748/wjg.v12.i14.2201.

177. Sakuraba A ea. An open-labeled trial of granulocyte and monocyte adsorption apheresis for pouchitis. *Gastroenterology* 2006;130(Suppl 2):A-661. 2006.

178. Tanaka T. et al. Efficacy of Adacolumn-selective leukocy- tapheresis in patients with steroid-naïve and steroid-dependent with moderate to severe ulcerative colitis. *Gastroenterol- ogy* 2006;130(Suppl 2):A-126. 2006.

179. Sakuraba A. A multicenter, randomized, controlled trial between weekly and semiweekly treatment with granulocyte and monocyte adsorption apheresis for active ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2005;128(Suppl 2): A-585.

180. Tomomasa T, Kobayashi A, Kaneko H, Mika S, Maisawa S-I, Chino Y, et al. Granulocyte adsorptive apheresis for pediatric patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* 2003;48:750–4. doi:10.1023/a:1022892927121.

181. Ikeda H, Ishimaru Y, Takayasu H, Fujino J, Kisaki Y, Otani Y, et al. Efficacy of granulocyte apheresis in pediatric patients with ulcerative colitis: A pilot study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;43:592–6. doi:10.1097/01.mpg.0000237928.07729.79.

182. Sawada K, Ohnishi K, Fukui S, Yamada K, Yamamura M, Amano K, et al. Leukocytapheresis therapy, performed with leukocyte removal filter, for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 1995;30:322–9.

183. Sawada K, Ohnishi K, Kosaka T, Chikano S, Yokota Y, Egashira A, et al. Leukocytapheresis with leukocyte removal filter as new therapy for ulcerative colitis. *Ther Apher.* 1997;1:207–11.

184. Sawada K, Muto T, Shimoyama T, Satomi M, Sawada T, Nagawa H, et al. Multicenter randomized controlled trial for the treatment of ulcerative colitis with a leukocytapheresis column. *Curr Pharm Des.* 2003;9:307–21.

185. Emmrich J, Petermann S, Nowak D, Beutner I, Brock P, Klingel R, 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.

186. Kosaka T, et al. Effect of leukocytapheresis therapy using leukocyte removal filter in Crohn's disease. *Intern med* 1999.

187. Yoshino et a. Efficacy and safety of granulocyte and monocyte adsorption apheresis for ulcerative colitis: A meta-analysis: Elsevier Ltd. 2014

188. Tanaka T, Okanobu H, Yoshimi S, Murakami E, Kogame A, Imagawa H, et al. In patients with ulcerative colitis, adsorptive depletion of granulocytes and monocytes impacts mucosal level of neutrophils and clinically is most effective in steroid naïve patients. *Dig Liver Dis.* 2008;40:731–6. doi:10.1016/j.dld.2008.02.012.

189. Rodríguez-Lago I, Gómez-Irwin L, Fernández E, Higuera R, Cabriada JL. Granulocyte-Monocyte Apheresis as an Adjuvant Therapy to Anti-Tumor Necrosis Factor Drugs for Ulcerative Colitis. *Ther Apher Dial.* 2017;21:26–30. doi:10.1111/1744-9987.12485.

190. Dignass A, Akbar A, Hart A, Subramanian S, Bommelaer G, Baumgart DC, et al. Safety and Efficacy of Granulocyte/Monocyte Apheresis in Steroid-Dependent Active Ulcerative Colitis with Insufficient Response or Intolerance to Immunosuppressants and/or Biologics the ART Trial: 12-week Interim Results. *J Crohns Colitis.* 2016;10:812–20. doi:10.1093/ecco-jcc/jw032.

191 Preine, Dirk von Nikkiso Europa. Telephonat am 21.3.2016 über den aktuellen Stand der Akzeptanz und der Verbreitung von Immunopure 2016.

192. Cabriada JL, Doménech E, Gomollón F, González-Carro P, González-Lara V, Hinojosa J, et al. Documento de consenso en el uso de la granulocitoaféresis en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol.* 2006;29:85–92.

193. Panés J, Guilera M, Ginard D, Hinojosa J, González-Carro P, González-Lara V, et al. Treatment cost of ulcerative colitis is apheresis with Adacolumn cost-effective? *Dig Liver Dis.* 2007;39:617–25. doi:10.1016/j.dld.2007.03.007.

194. Compendium.ch. Fachinformation Mesalazin. 2016.

195. Hibi T, Sameshima Y, Sekiguchi Y, Hisatome Y, Maruyama F, Moriwaki K, et al. Treating ulcerative colitis by Adacolumn therapeutic leucocytapheresis: Clinical efficacy and safety based on surveillance of 656 patients in 53 centres in Japan. *Dig Liver Dis.* 2009;41:570–7. doi:10.1016/j.dld.2008.11.020.

196. Nagase K, Sawada K, Ohnishi K, Egashira A, Ohkusu K, Shimoyama T. Complications of leukocytapheresis. *Ther Apher.* 1998;2:120–4.

197. Jeon SR. Is Adsorptive Granulocyte and Monocyte Apheresis Effective as an Alternative Treatment Option in Patients with Ulcerative Colitis? *Gut Liver.* 2017;11:171–2. doi:10.5009/gnl17028.

198. Lai Y-M, Yao W-Y, He Y, Jiang X, Gu Y-B, Chen M-H, et al. Adsorptive Granulocyte and Monocyte Apheresis in the Treatment of Ulcerative Colitis: The First Multicenter Study in China. *Gut Liver.* 2017;11:216–25. doi:10.5009/gnl15408.

199. Sawada K, Egashira A, Ohnishi K, Fukunaga K, Kusaka T, Shimoyama T. Leukocytapheresis (LCAP) for management of fulminant ulcerative colitis with toxic megacolon. *Dig Dis Sci.* 2005;50:767–73. doi:10.1007/s10620-005-2571-3.

200. Robert et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? 2009.

201. www.immundefekt.de/cd. Die CD Nomenklatur.

202. Tomasits B. Apoptosedetektion mittels Annexin V - Markierung.
http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_annexin.htm.

203. Rücksprache mit den Probanden. Fragebogen & Telefoninterview zur Evaluierung 1 Jahr nach AWB. Interview by Matthias Schneider.

204. Takemoto K, Kuriyama M, Kato J, Suzuki H, Ishikawa S, Hiraoka S, Yamamoto K. 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. doi:10.1111/j.1744-9987.2009.00649.x.

205. Fukunaga K, Fukuda Y, Yokoyama Y, Ohnishi K, Kusaka T, Kosaka T, et al. Activated platelets as a possible early marker to predict clinical efficacy of leukocytapheresis in severe ulcerative colitis

206. Brubaker LH, Nolph KD. Mechanisms of recovery from neutropenia induced by hemodialysis. *Blood*. 1971;38:623–31.

207. Schreiber S. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa: Neue Erkenntnisse zur Immunpathogenese.

208. Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002;168:3536–42.

209. Al-Amadi O, Jodeleit H, Beigel F, Wolf E, Siebeck M, Groppe R. CD1a-Expressing Monocytes as Mediators of Inflammation in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2018. doi:10.1093/ibd/izy073.

210. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Yamada M, Kikuyama M, et al. Adsorptive depletion of elevated proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1210–6. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01714.x.

211. Gao Y-H, Gao P-J, Wang C-G, Wang X-C, Piao Y-F. Relationship and significance between anti-beta2-glycoprotein I antibodies and platelet activation state in patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2008;14:771–5.

212. Butera A, Sanchez M, Pronio A, Amendola A, Nitto D de, Di Carlo N, et al. CD3+CD4+LAP+Foxp3-Regulatory Cells of the Colonic Lamina Propria Limit Disease Extension in Ulcerative Colitis. *Front Immunol*. 2018;9:2511. doi:10.3389/fimmu.2018.02511.

213. Ng SC et. al. A novel population of human CD56+ human leucocyte antigen D-related (HLA-DR+) colonic lamina propria cells is associated with inflammation in ulcerative colitis: Blackwell Science Inc; 2009-11.

214. Werner L, Nunberg MY, Rechavi E, Lev A, Braun T, Haberman Y, et al. Altered T cell receptor beta repertoire patterns in pediatric ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2018. doi:10.1111/cei.13247.

215. Gao Y-H, Gao P-J, Wang C-G, Li Y-r, Wang D, Li Y-q, Piao Y-F. [Relations of ulcerative colitis to anti-beta2-glycoprotein antibodies and to platelet activation status]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006;86:3118–21.

216. Pamuk GE, Vural O, Turgut B, Demir M, Umit H, Tezel A. Increased circulating platelet-neutrophil, platelet-monocyte complexes, and platelet activation in patients with ulcerative colitis: a comparative study. *Am J Hematol*. 2006;81:753–9. doi:10.1002/ajh.20655.

217. Waitz G. New White Blood Cell Adsorbent: Immunopure: Short running title: Immunopure apheresis in vitro and in vivo.

218. Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, Gaetano G de. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thromb Res*. 2012;129:263–6. doi:10.1016/j.thromres.2011.10.010.

219. Henn V, Slupsky J. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998.

220. Vowinkel T, Anthoni C, Wood KC, Stokes KY, Russell J, Gray L, et al. CD40-CD40 ligand mediates the recruitment of leukocytes and platelets in the inflamed murine colon. *Gastroenterology*. 2007;132:955–65. doi:10.1053/j.gastro.2006.12.027.

221. Nikkiso Co. J. Electron microscope photograph of the PAR bead surface with an attached white blood cell and numerous platelets

222. Komoto S, Matsuoka K, Kobayashi T, Yokoyama Y, Suzuki Y, Hibi T, et al. Safety and efficacy of leukocytapheresis in elderly patients with ulcerative colitis: The impact in steroid-free

elderly patients. *J Gastroenterol Hepatol.* 2018;33:1485–91. doi:10.1111/jgh.14116.

223. Höie O, Schouten LJ, Wolters FL, Solberg IC, Riis L, Mouzas IA, et al. Ulcerative colitis: no rise in mortality in a European-wide population based cohort 10 years after diagnosis. *Gut.* 2007;56:497–503. doi:10.1136/gut.2006.101519.

224. Brown C, Gibson PR, Hart A, Kaplan GG, Kachroo S, Ding Q, et al. Long-term outcomes of colectomy surgery among patients with ulcerative colitis. *Springerplus.* 2015;4:573. doi:10.1186/s40064-015-1350-7.

225. Turner D, Levine A, Escher JC, Griffiths AM, Russell RK, Dignass A, et al. Management of pediatric ulcerative colitis: Joint ECCO and ESPGHAN evidence-based consensus guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;55:340–61. doi:10.1097/MPG.0b013e3182662233.

226. Turner D, Ruemmele FM, Orlanski-Meyer E, Griffiths AM, Carpi JM de, Bronsky J, et al. Management of Paediatric Ulcerative Colitis, Part 1: Ambulatory Care-An Evidence-based Guideline From European Crohn's and Colitis Organization and European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;67:257–91. doi:10.1097/MPG.0000000000002035.

227. Ramlow W. Zytapherese bei Colitis ulcerosa: Die Studienlage entspricht noch nicht den positiven Erfahrungen. *Dialyse aktuell.* 2012.

228. Kruis W. Novel Leucocyte/Thrombocyte Apheresis for Induction of Steroid-Free Remission in Ulcerative Colitis: A Controlled Randomized Pilot Study. In: *Journal of Crohn's and Colitis,* 2019, 1–5.

229. Nagase K, Fukuanga K, Yokoyama Y, Kamikozuru K, Miwa H, Nakamura S. Questionnaire based assessment of patients' acceptability of leukocytapheresis for the treatment of inflammatory bowel disease. *Ther Apher Dial.* 2013;17:490–7. doi:10.1111/1744-9987.12115.

230. Paolo Armignacco et al. Wearable Devices for Blood Purification: Principles, Miniaturization, and Technical Challenges.

231. Takayama T, Kanai T, Matsuoka K, Okamoto S, Sujino T, Mikami Y, et al. Long-term prognosis of patients with ulcerative colitis treated with cytapheresis therapy. *J Crohns Colitis.* 2013;7:54. doi:10.1016/j.crohns.2012.05.005.

232. Suzuki Y, Yoshimura N, Fukuda K, Shirai K, Saito Y, Saniabadi AR. A retrospective search for predictors of clinical response to selective granulocyte and monocyte apheresis in patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* 2006;51:2031–8. doi:10.1007/s10620-006-9199-9.

233. Takemoto K, Kato J, Kuriyama M, Nawa T, Kurome M, Okada H, et al. Predictive factors of efficacy of leukocytapheresis for steroid-resistant ulcerative colitis patients. *Dig Liver Dis.* 2007;39:422–9. doi:10.1016/j.dld.2007.01.010.

234. Sakuraba A, Motoya S, Watanabe K, Nishishita M, Kanke K, Matsui T, et al. An open-label prospective randomized multicenter study shows very rapid remission of ulcerative colitis by intensive granulocyte and monocyte adsorptive apheresis as compared with routine weekly treatment. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:2990–5. doi:10.1038/ajg.2009.453.

235. Yamamoto T, Umegae S, Matsumoto K. Daily granulocyte and monocyte adsorptive apheresis in patients with active ulcerative colitis: a prospective safety and feasibility study. *J Gastroenterol.* 2011;46:1003–9. doi:10.1007/s00535-011-0428-4.

236. Yoshimura N, Tadami T, Kawaguchi T, Sako M, Yoshimoto H, Yamaka T, Takazoe M. Processed blood volume impacts clinical efficacy in patients with ulcerative colitis undergoing adsorptive depletion of myeloid lineage leucocytes. *J Gastroenterol.* 2012;47:49–55. doi:10.1007/s00535-011-0464-0.

237. Gia Phuong Nguyen. Klinisch- und Biomarker-adaptierte Behandlung der moderaten bis schwergradigen, therapierefraktären Colitis ulcerosa mittels Granulozyten-Monozyten/Makrophagen-Apherase

238. Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L, Bellini M, Romano MR, Sterpi C, et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut.* 2005;54:364–8. doi:10.1136/gut.2004.043406.

239. Kucharzik et al. Aktualisierung der S3-Leitlinie Colitis Ulcerosa 2019. *Z Gastroenterol;* 2019;1279–80.

Anhang

Thesen

Abbildungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Adressenverzeichnis

Auflistung von verwendeten Antikörpern und Isotypkontrollen

Erklärung

Fragebogen

Tabellenverzeichnis

Thesen

- Der Anstieg von Inzidenz und Prävalenz der Colitis ulcerosa verdeutlicht, dass diese weltweit als Volkskrankheit einer immer stärkeren Wahrnehmung bedarf.
- Die Erkrankung trifft Menschen in den produktivsten und aktivsten Jahren ihres Lebens - dies bedeutet sowohl große persönliche Einschneidungen und Kosten für den Patienten, als auch für die Gesellschaft und damit folgend dem Gesundheitssystem.
- Die medikamentöse Standardtherapie basiert auf einer unspezifischen Entzündungshemmung und einer immunsuppressiven Therapie. Eingesetzt werden Aminosalizylate, Steroide, anti-TNF- α -Antikörpern (Infliximab, Adalimumab, Golimumab) oder Calcineurin-Inhibitoren wie Tacrolimus oder Ciclosporin A
- Die medikamentöse Therapie kann bei mehr als 10% der Patienten keine langfristige Remission etablieren.
- CED-Patienten haben ein großes Interesse an neuen und nebenwirkungsarmen Therapiestrategien.
- Die Apherese ist eine nebenwirkungsarme und sichere Therapiemethode, die singulär oder additiv im Therapiekonzept eingesetzt werden kann und somit Medikamente und deren Nebenwirkungen verringern sowie chirurgische Interventionen hinauszögern bzw. vermeiden kann.
- Bei der vorliegenden Arbeit wurde das neuartige Apherese-Verfahren Immunopure® in einem Rezirkulationsmodell in vitro in Bezug auf Wirkungsweise und Effektivität und in einer prospektiven Anwendungsbeobachtung in vivo an sechs Colitis ulcerosa-Patienten untersucht.
- Das Verfahren gewährleistet ein hohes Maß an Sicherheit dadurch, dass keine weiteren Substanzen benötigt werden, die Nebenwirkungen oder andere unerwünschte Ereignisse verursachen könnten.
- Die Apherese ist ein kosteneffektives Therapieverfahren
- Verschiedene Studien haben bewiesen, dass die Apherese einer Therapie mit Steroiden bzgl. der Remissionsinduktion überlegen sein kann.
- Thrombozyten sind zu beachtende Target-Zellen in der Therapie der Colitis ulcerosa.
 - ❖ Thrombozyten, als auch von Thrombozyten produzierte Zellen und Partikel wie Mikropartikel, Selektine oder der CD40-Ligand wirken proinflammatorisch in der Pathogenese der Colitis ulcerosa.
 - ❖ Der Zusammenhang zwischen einer effektiven Thrombozyteneliminierung und dem Erfolg einer Apherese ist durch Studien belegt.
 - ❖ Thromboembolismus ist einer der Hauptgründe für Morbidität und Mortalität bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.

- Immunopure® kann bis zu 80% der Thrombozyten eliminieren, während andere Verfahren nur eine deutlich geringere oder gar keine Wirkung auf Thrombozyten zeigen
- Die Behandlung mittels Immunopure® konnte sowohl in den in vitro-Versuchen als auch in vivo die Thrombozytenanzahl signifikant reduzieren.
- In dieser AWB war die Apherese am wirksamsten bei Patienten, bei denen die Thrombozyten am effektivsten eliminiert werden konnten.
- Die Thrombozytenanzahl konnte nach 15 Minuten durch die Adsorberpassage sowohl in vitro als auch in vivo am stärksten reduziert werden und erholt sich durch einen erhöhten Nachstrom aus anderen Kompartimenten und aufgrund eines Sättigungseffektes der PAR-Kugeln im Verlauf wieder
- Eine dauerhafte Reduzierung der Thrombozyten und somit eine mögliche klinisch kritische Thrombozytopenie wurde nicht beobachtet
- V.a. bei Patienten mit erhöhten Thrombozytenzahlen und / oder Koagulationsproblemen sollte Immunopure® in einer Apheresetherapie bedacht werden.
- Immunopure® kann auch weitere proinflammatorische Zellen wie CD14+tragende Monozyten, CD14+CD16+tragende Monozyten, CD10+-Granulozyten und neutrophile Granulozyten effektiv eliminieren und wirkt somit multimodaler, als es vergleichbare Verfahren tun.
- Auch sog. Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate scheinen zur Pathogese mukosaler Läsionen und zum erhöhten Risiko systemischer Thrombosen bei Colitis ulcerosa beizutragen
- Auf Thrombozyten-Monozyten-Aggregate (CD42b+CD14b+) wirkte Immunopure® stark eliminierend, während auf Thrombozyten-T-Zell-Aggregate (CD42b+CD3+) und Thrombozyten-CD11b-Aggregate nur nach 15 Minuten eine eliminierende Wirkung dargestellt werden konnte.
- Im Vergleich mit anderen erhältlichen Apheresesystemen zeigt Immunopure® ähnlich gute (Adacolumn®) oder höhere Remissionsraten (Cellsorba®, Immuloc®).
- In dieser AWB konnte ein Ansprechen von 83% und eine Remissionsrate von 67% erhoben werden.
- Hindernd an der Anwendung von Aphereseverfahren im klinischen Alltag sind Unwissenheit, initial größere Kosten und der für alle Seiten erforderliche Aufwand einer extrakorporalen Blutreinigung
- Auf Mikropartikel, Selektine oder CD40-Liganden hat Immunopure® keine eliminierende Wirkung
- In Bezug auf weitere Zielzellen wie Granulozyten oder Lymphozyten zeigte sich bei der Apherese durch Immunopure® keine bessere Wirkung als bei anderen Apheresegeräten.
- Die Ergebnisse in der Anwendungsbeobachtung ließen sich im Rezirkulationsmodell weitestgehend reproduzieren. Das Modell war daher dafür geeignet, Adsorptionsprozesse am Adsorber zu analysieren. Wechselwirkungen mit anderen Elementen wie Organen oder Medikamenten waren dabei jedoch ausgeschlossen.

- Die Apherese sollte nicht unreflektiert, sondern bei einem ausgewählten Patientenkollektiv erfolgen und hierbei individuell auf die Krankheitsverläufe eingestellt werden.
- V.a. in einem erfolgsversprechenden Patientenklientel (jüngeres Patientenalter, längerer Krankheitsverlauf, frühzeitiger Einsatz nach Diagnose, Steroidnaivität) als auch bei Risikopatienten (Kindern oder Schwangeren, sowie Patienten die aufgrund der Nebenwirkungen, der Intoleranz oder Wirkungslosigkeit von einer medikamentösen Therapie nicht profitieren können) sollte die Apherese möglichst früh in einem Therapiekonzept diskutiert werden.
- Patienten mit einer schwachen Krankheitsaktivität, tiefen Mukosaläsionen, einem erheblichen Verlust intestinalen Gewebes und einer Therapierefraktivität gegenüber der bisherigen medikamentösen Therapie profitieren meist weniger von der Apherese.
- Ein Standarttherapieschema skizziert eine Frequenz von einer Therapie pro Woche über 60 Minuten und über einen Zeitraum von fünf Wochen. Prinzipiell sollte je nach Krankheitsverlauf und Gesundheitszustand eine individuell angepasste Therapie-Frequenz angewandt werden.
- Durch Scheinapherese werden Zellen aktiviert – daher muss postuliert werden, dass eine Scheinapherese nicht mit einem Placebo verglichen werden und eine stärkere therapeutische Wirkung als diese haben kann.
- Den guten klinischen Erfahrungen mit Immunopure® und anderen Aphereseverfahren zum Trotz muss konzediert werden, dass es bisher keine doppelblind-randomisierte Studie gibt die die Wirkung und Überlegenheit der Apherese oder speziell von Immunopure® bewiesen hat.
- Die genaue Positionierung der Zytapherese in der Therapie der aktiven chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist aufgrund der unterschiedlichen Studienergebnisse gegenwärtig umstritten.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Pathogenese der Colitis ulcerosa auf mukosaler Ebene nach Waitz et al. [25]: Antigene passieren gestörte Tight Junctions und aktivieren in der Mukosa Thrombozyten und Immunzellen wie T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen. Es folgt eine inadäquate Immunantwort in genetisch prädisponierten Patienten.
Abbildung 2	Molekulare Struktur von Polyarylat-Resin [162]
Abbildung 3	Immunopure® -Zytapheresesystem: Adsorber
Abbildung 4	Immunopure® -Zytapheresesystem: Blutmonitor
Abbildung 5	Abmessungen des verkleinerten Adsorbermoduls.
Abbildung 6	Rezirkulationsmodell mit Immunopure®-Minimodul (gefüllt mit Polyarylat-Resin-Kugeln) mit einem Volumen von 40 ml. 250 ml heparinisiertes (1 IU/ml) Blut von einem gesunden Spender rezirkulierten durch das mit NaCl vorgespülte Modul bei einem Blutfluss von 7,5 ml/min und 37 °C für eine Untersuchungszeit von 60 min.
Abbildung 7	Versuchsaufbau des Rezirkulationsmodells.
Abbildung 8	Bestimmung zirkulierender Mikropartikel aus Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie. A: Megamix-Partikel zur Definition der Mikropartikel-Größe mit einem Durchmesser von 0,5 µm (1), 0,9 µm (2), 3 µm (3). Gate (4) wurde oberhalb der 0,9 µm Partikel definiert. B: Ermittlung der Zählpunkte der Truecount-Tubes pro Messung (Anzahl der Ereignisse in (5)). C-E: Aktivierung von Gate (4), C: Annexin-V PE-Färbung; D: CD42b FITC- und Annexin-V PE-Färbung, E: Kontrolle ohne Antikörper bzw. Annexin-V PE.
Abbildung 9 A	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf Hämoglobin
Abbildung 9 B	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf Hämatokrit
Abbildung 9 C	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf Thrombozyten
Abbildung 9 D	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf Monozyten
Abbildung 9 E	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf Lymphozyten
Abbildung 9 F	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf Leukozyten
Abbildung 9 G	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf neutrophile Granulozyten
Abbildung 9 H	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf eosinophile Granulozyten
Abbildung 9 I	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf basophile Granulozyten
Abbildung 10 A	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD10+-Granulozyten
Abbildung 10 B	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD14+-Monozyten / Makrophagen
Abbildung 10 C	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD14+CD16+-Monozyten
Abbildung 10 D	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD62L+CD11b+-Leukozyten
Abbildung 10 E	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD62L+-Zellen
Abbildung 10 F	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf Mean-CD62L-Zellen
Abbildung 10 G	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD11b+-Zellen
Abbildung 10 H	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf MeanCD11b-Zellen
Abbildung 10 I	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD42b+CD11b+-Zellaggregate
Abbildung 10 J	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD42b+CD3+-Zellaggregate
Abbildung 10 K	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD42b+CD14+-Zellaggregate
Abbildung 10 L	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD42b+CD62P+-Zellaggregate
Abbildung 10 M	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD42b+CD63+-Zellaggregate
Abbildung 10 N	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD3+CD4+-Zellaggregate
Abbildung 10 O	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD3+CD8+-Zellaggregate
Abbildung 10 P	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD3+TCRgd+-Zellaggregate
Abbildung 10 Q	Rezirkulationsmodell - Wirkung der Module auf CD3+HLADR+-Zellaggregate
Abbildung 11	Anzahl von Thrombozyten assoziierten Mikropartikel während des Rezirkulationsversuches

Abbildung 12	Wirkung des in vitro-Rezirkulationsversuchs auf die sP-Selektin-Konzentration
Abbildung 13	Konzentration von CD40-Liganden beim in-vitro-Rezirkulationsversuch
Abbildung 14 A	Bilder eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes von PAR-Kugeln des Immunopure®-Adsorbers: CD42b (grün), CD11b (rot)
Abbildung 14 B	Bilder eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes von PAR-Kugeln des Immunopure®-Adsorbers: CD42b (grün), CD14 (rot)
Abbildung 14 C	Bilder eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes von PAR-Kugeln des Immunopure®-Adsorbers: CD42b (rot), CD3 (rot)
Abbildung 14 D	Bilder eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes von PAR-Kugeln des Immunopure®-Adsorbers: Fibrinogen (grün), CD42b (rot)
Abbildung 14 E	Bilder eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes von PAR-Kugeln des Immunopure®-Adsorbers: E: CD42b (grün), CD11b (rot)
Abbildung 14 F	Bilder eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes von PAR-Kugeln des Immunopure®-Adsorbers: CD42b (grün), CD14 (rot)
Abbildung 14 G	Bilder eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes von PAR-Kugeln des Immunopure®-Adsorbers: CD42b (rot), CD3 (rot)
Abbildung 14 H	Bilder eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes von PAR-Kugeln des Immunopure®-Adsorbers: Fibrinogen (grün), CD42b (rot)
Abbildung 14 I	Bilder eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes von PAR-Kugeln des Immunopure®-Adsorbers: Kontrolle ohne primären Antikörper - nach der Blutzirkulation
Abbildung 15	Mittelwerte der Vitalparameter der Patienten am Anfang und Ende jeder Behandlung
Abbildung 16 A	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf Hämoglobin
Abbildung 16 B	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf Hämatokrit
Abbildung 16 C	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf Thrombozyten
Abbildung 16 D	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf Monozyten
Abbildung 16 E	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf Lymphozyten
Abbildung 16 F	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf Leukozyten
Abbildung 16 G	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf neutrophile Granulozyten
Abbildung 16 H	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf eosinophile Granulozyten
Abbildung 16 I	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf basophile Granulozyten
Abbildung 17 A	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD10+-Granulozyten
Abbildung 17 B	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD14+-Monozyten / Makrophagen
Abbildung 17 C	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD14+CD16+-Monozyten
Abbildung 17 D	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD62L+CD11b+-Leukozyten
Abbildung 17 E	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD62L+-Zellen
Abbildung 17 F	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf Mean-CD62L-Zellen
Abbildung 17 G	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD11b+-Zellen
Abbildung 17 H	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf MeanCD11b-Zellen
Abbildung 17 I	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD42b+CD11b+-Zellaggregate
Abbildung 17 J	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD42b+CD3+-Zellaggregate
Abbildung 17 K	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD42b+CD14+-Zellaggregate
Abbildung 17 L	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD42b+CD62P+-Zellaggregate
Abbildung 17 M	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD42b+CD63+-Zellaggregate
Abbildung 17 N	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD3+CD4+-Zellaggregate
Abbildung 17 O	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD3+CD8+-Zellaggregate
Abbildung 17 P	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD3+TCRgd+-Zellaggregate
Abbildung 17 Q	Anwendungsbeobachtung - Wirkung der Module auf CD3+HLADR+-Zellaggregate

Abbildung 18	Wirkung der Apherese auf Thrombozyten assoziierte Mikropartikel
Abbildung 19	Wirkung der Apherese auf die sP-Selektinkonzentration im Plasma im Rahmen der Behandlung mit Immunopure®
Abbildung 20	Wirkung der Apherese auf die CD40-Liganden-Konzentration in der ersten, dritten und fünften Woche der Behandlung mit Immunopure®
Abbildung 21	Wie erging es Ihnen nach der AWB-Teilnahme im Vergleich zum vorherigen Befinden? Antwortmöglichkeiten: „wesentlich verbessert“, „besser“, „leicht verbessert“, „keine Veränderung“, „geringfügig schlechter“ oder „wesentlich schlechter“
Abbildung 22	Als wie lohnenswert empfanden Sie das Ergebnis der Therapie im Angesicht des erforderlichen Aufwandes wie Anfahrt, Punktion, zeitlicher Aufwand? Antwortmöglichkeiten: „sehr lohnenswert“, „lohnenswert“, „gering lohnenswert“, „neutral“, „nicht lohnenswert“ oder „Zumutung“.
Abbildung 23	PAR-Oberfläche mit anhaftenden Leukozyten und Thrombozyten [221]
Abbildung 24	Postulierte Wirkung der Adsorption von Plättchen-Leukozyten-Komplexen an Fibrin und weiterer Zellen wie Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie der Adsorption von Zellen / Zellaggregaten an dem Adsorber über Komplement- / Immunkomplexe [217]

Abkürzungen

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
Abb	Abbildung
APC	Allophycocyanin
anti-HCV	Anti Hepatitis-C-Virus
BSA	Bovine Serum Albumin
C. difficile	Clostridium difficile
CAI	Klinischer Aktivitätsindex (nach Rachmilewitz)
CD	Cluster of Differentiation (CD)
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CMV	Cytomegalievirus
CRP	C-Reaktives Protein
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten e.V.
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECCO	Europäische Organisation für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa
EcN	Escherichia coli Nissle
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMT	fäkale Mikrobiom Transplantation
GMCAP	Granulozyten/Monozyten Apherese
HBsAG	englisch: HBV surface antigen ,HBV-Oberflächenantigen
HCV-RNA	Hepatitis C RNA
HLA	Human Leukocyte Antigens
IF	Interferon
IPAA	ileoanale Pouch-Anastomose
LBP	Lipopolsaccharidbindendem Protein
LCAP	Leukozytenapherese
LDL	Low-density Lipoprotein
MAdCAM	„Vascular addressin cell adhesion molecule“
miRNAs	microRNA - Nichtcodierende Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NKT-Zellen	Natürlichen Killer T-Zellen
NOD	„Nucleotide-binding oligomerization domain“
PAR	Polyarylat-Resin
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
pANCA	perinukleäre anti-Neutrophile cytoplasmatischen Antikörper
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Protei
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PSGL	P-selectin Glycoprotein Ligand
PRR	Pattern-Recognition Receptors
Tab.	Tabelle
Tbc	Tuberkulose

TH	T-Helperzelle
TLR	Toll-like Rezeptoren
v.a.	vor allem
vWF	Willebrand-Faktors
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Adressverzeichnis

anthos Mikrosysteme GmbH	Kimplerstraße 290, 47807 Krefeld
Asahi Kasei Europe GmbH	Am Seestern 4 - 40547 Düsseldorf
B.Braun Avitum AG	Carl-Braun-Straße 1 34212 Melsungen
BD Bioscience	2350 Qume Dr, San Jose, CA 95131, USA
Biocytex	40 Chemin de l'Armée d'Afrique, 13010 Marseille, Frankreich
Dispomed Witt oHG	Am Spielacker 10, 63791 Gelnhausen
European Crohn's and Colitis Organisation - ECCO	- Ungargasse 6/13, A-1030 Wien, Österreich
Grit Waitz - MVZ Nephrocare Rostock	Nobelstraße 53 18059 Rostock
Hettich GmbH & Co. KG	Föhrenstraße 12, 78532 Tuttlingen
IBM Deutschland GmbH	IBM-Allee 1, 71139 Ehningen
Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik	Janke und Kunkel-Straße 10, 79219 Staufen im Breisgau
JIMRO Co. , Ltd.	351-1, Nishiyokote, Takasaki, Gunma, 370-0021, Japan
Matthias Schneider	Flachsland 16 22083 Hamburg
Medizinisches Labor Rostock-	Südring 81, 18059 Rostock
Membrana GmbH/3M	Öhder Str. 28, 42289 Wuppertal
neoLab	Rischerstraße 7-9, 69123 Heidelberg
Nikkiso Co., Ltd.	Desbrocksriede 1, 30855 Langenhagen
Olympus America Inc.	3500 Corporate Pkwy, Center Valley, PA 18034, USA
OTSUKA Pharmaceutical Europe Ltd.	Gallions Wexham Springs Framework Road United Kingdom, SL3 6PJ
PAA - Laboratories	PAA-Str. 1, 4061 Pasching, Oberösterreich
Ratiopharm	Graf-Arco-Str. 3 89079 Ulm
R&D Systems	Borsigstraße 7, 65205 Wiesbaden
SARSTEDT AG & Co. KG	Sarstedtstraße 1, 51588 Nümbrecht
SPL Life Sciences Co., Ltd.	26, Geumgang-ro 2047 beon-gil, Naechon-Myeon, Pocheon-si, Gyeonggi-do 487 835, Korea
Universitätsklinikum Rostock	Schillingallee 35, 18057 Rostock
Wolfgang Ramlow MVZ Nephrocare Rostock	Nobelstraße 53 18059 Rostock

Auflistung von verwendeten Antikörpern und Isotypkontrollen

FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	PE (Phycoerythrin)	PerCP (Peridinin-Chlorophyll Protein)	APC (Allophycocyanin)
aus EDTA Röhrchen			
CD4 mlgG1 5µl	CD8 mlgG1 5µl	-	CD3 mlgG1 5µl
Isotypkontrolle mlgG1 (Komb.) 5µl	mlgG1	mlgG1 5µl	mlgG1 5µl
-	CD10 mlgG2a 5µl	-	-
CD62L mlgG1 5µl	CD11b mlgG1 5µl	-	-
-	mlgG2a 5µl	mlgG2b 5µl	-
-	TCR γ/δ mlgG1 5 µl	-	CD3 mlgG1 5µl
-	HLA-DR mlgG2a 2µl	-	CD3 mlgG1 5µl
CD86 mlgG1 8µl	CD14 mlgG2a	-	CD16 mlgG1
CD4 mlgG1 5µl	-	-	CD25 mlgG1 5µl
aus Citrat Röhrchen			
mlgG1 5µl	CD63 mlgG1 5µl	-	CD62P mlgG1 5µl
CD42b mlgG1 5µl	CD11b mlgG2a 5 µl	-	-
CD42b mlgG1 5µl	mlgG1	mlgG1 5µl	mlgG1 5µl
mlgG1 5µl	mlgG2a 5µl		

Eidesstattliche Erklärung

Matthias Schneider

Geb. 14.01.1989 in Flensburg

Wohnhaft Flachsland 16, 22083 in Hamburg

Hiermit erkläre ich durch meine Unterschrift an Eides statt:

1. Die eingereichte Dissertation mit dem Titel „Die adsorptive Zytapherese bei Colitis ulcerosa mit zusätzlicher Thrombozyten-Modulation - In-vitro und in-vivo Versuche mit einem neuen Adsorbermodul“ habe ich selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst. Hierbei habe ich weder Textstellen von Dritten oder aus eigenen Prüfungsarbeiten, noch Grafiken oder sonstige Materialien ohne Kennzeichnung übernommen.
2. Es sind ausschließlich die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet worden.
3. Sämtliche wörtliche und nicht wörtliche Zitate aus anderen Werken sind gemäß den wissenschaftlichen Zitierregeln kenntlich gemacht.
4. Die von mir vorgelegte Arbeit ist bisher noch nicht, auch nicht teilweise, veröffentlicht worden.
5. Die von mir vorgelegte Arbeit ist bisher noch in keiner Form als Bestandteil einer Prüfungs-/Qualifikationsleistung vorgelegt worden.
6. Die von mir eingereichte Dissertation habe ich unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis erstellt.
7. Die geltende Promotionsordnung ist mir bekannt.
8. Über die Bedeutung und die strafrechtlichen Folgen einer falschen eidesstattlichen Erklärung gemäß § 156 StGB bin ich mir bewusst.
9. Ich erkläre an Eides statt, dass meine Angaben der Wahrheit entsprechen und ich diese nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe.

Fragebogen – Cytapherese bei Colitis ulcerosa

Name:

Geschlecht:

Geburtsdatum:

Wie erging es Ihnen nach der Studienteilnahme im Vergleich zum vorherigen Befinden?

<input type="checkbox"/> <i>Wesentlich besser</i>	<input type="checkbox"/> <i>leicht verbessert</i>	<input type="checkbox"/> <i>geringfügig schlechter</i>
<input type="checkbox"/> <i>besser</i>	<input type="checkbox"/> <i>keine Veränderung</i>	<input type="checkbox"/> <i>wesentlich schlechter</i>
<input type="checkbox"/> <i>Sonstiges:</i> _____		

Sofern Sie eine Verbesserung gespürt haben, wie lange hielt diese an?

Wie geht es Ihnen heute im Vgl. zum Zeitpunkt nach der Studienteilnahme?

<input type="checkbox"/> <i>Wesentlich besser</i>	<input type="checkbox"/> <i>leicht verbessert</i>	<input type="checkbox"/> <i>geringfügig schlechter</i>
<input type="checkbox"/> <i>besser</i>	<input type="checkbox"/> <i>keine Veränderung</i>	<input type="checkbox"/> <i>wesentlich schlechter</i>
<input type="checkbox"/> <i>Sonstiges:</i> _____		

Als wie lohnenswert empfanden Sie das Ergebnis der Therapie im Angesicht des erforderlichen Aufwandes (Anfahrt, Punktions, Zeitlicher Aufwand):

<input type="checkbox"/> <i>Sehr lohnenswert</i>	<input type="checkbox"/> <i>Ogering lohnenswert</i>	<input type="checkbox"/> <i>nicht lohnenswert</i>
<input type="checkbox"/> <i>lohnenswert</i>	<input type="checkbox"/> <i>neutral</i>	<input type="checkbox"/> <i>als Zumutung</i>
<input type="checkbox"/> <i>Sonstiges:</i> _____		

Würden Sie an weiteren Apheresebehandlungen teilnehmen?

Ja - Warum? _____

Nein – Warum nicht? _____

Unentschlossen

Wenn ja, in welchem Rhythmus?

<input type="checkbox"/> <i>mehrmals pro Woche</i>	<input type="checkbox"/> <i>mehrmals im Monat (3-4x)</i>	<input type="checkbox"/> <i>mehrmals im Jahr (5-10x)</i>
<input type="checkbox"/> <i>mehrmals im Monat (1-2x)</i>	<input type="checkbox"/> <i>mehrmals im Jahr (1-5x)</i>	<input type="checkbox"/> <i>sonstig:</i> _____

Was für eine medikamentöse Therapie haben Sie seit der Studie erhalten und in welchem Zeitraum?

- Therapie 1:

_____ von/bis _____
 abgebrochen, weil: _____ / *nicht abgebrochen*

- Therapie 2: _____ von/
bis _____

abgebrochen, weil: _____ / *nicht abgebrochen*

- Therapie 3: _____ von/
bis _____

abgebrochen, weil: _____ / *nicht abgebrochen*

- Therapie 4: _____ von/
bis _____

abgebrochen, weil: _____ / nicht abgebrochen

- keine Therapie

haben, können Sie diesen auch kopieren und beilegen)

Wie und von Wem werden Sie zum aktuellen Zeitpunkt ärztlich betreut? Seit wann?

Allgemeinarzt: _____

weitere Betreuung: _____

Schildern Sie bitte kurz Ihre Erwartungen, mit denen Sie an die Apheresetherapie herangetreten sind: Welche Fortschritte/ Wirkung der Apherese haben Sie sich erhofft?

Haben Sie noch weitere Anmerkungen zu Ihrer Teilnahme an der Studie?

Bei weiteren offenen Fragen würden wir Sie sehr gern kontaktieren. Sind Sie damit einverstanden und auf welchem Wege dürften wir dies tun?

Telefonisch:

E-Mail:

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Krankheitsaktivität der Colitis ulcerosa nach Truelove & Witts [11]
Tabelle 2	Mayo-Score zur Aktivitätsbeurteilung der Colitis ulcerosa [77]
Tabelle 3	Klinischer Aktivitätsindex nach Rachmilewitz [78]
Tabelle 4	Vergleich der erhältlichen Apheresesysteme nach Danese [147]*1, Tiburtius [164]*2 und Ramlow [1]*3
Tabelle 5	Studien bzgl. der Effektivität von Adacolumn in der Behandlung von erwachsenen / pädiatrischen Patienten bei der Colitis ulcerosa. („generelles Ansprechen“ beinhaltet Ansprechen auf Therapie und Remission) – nach Danese [147]
Tabelle 6	Studien bzgl. der Effektivität von Cellsorba in der Behandlung von erwachsenen / pädiatrischen Patienten bei der Colitis ulcerosa / M. Crohn. („generelles Ansprechen“ beinhaltet Ansprechen auf Therapie und Remission) – nach Danese [147]
Tabelle 7	Patientencharakteristika.
Tabelle 8	Untersuchungsparameter und Zeitpunkte der Probenentnahme.
Tabelle 9	Auflistung der humanen CD-Antigene [201]
Tabelle 10	Primärantikörper für die Immunfluoreszenz.
Tabelle 11	Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz.
Tabelle 12	Vorstellung der Patientencharakteristika, der bisherigen medizinischen Therapie sowie des CAI nach Rachmilewitz vor Therapie, sowie fünf Wochen nach Therapieende
Tabelle 13	Veränderungen einzelner Zellsorten über fünf Wochen. Es werden Durchschnittswerte und Standartabweichungen aller sechs Probanden aufgeführt. Statistisch verglichen wurden die Ergebnisse mit dem Ausgangswert in Minute 0 (100%) mittels Wilcoxon-Test (n=6)(*P<0,05)
Tabelle 14	Subjektiver Zustand der Patienten im Vergleich vor- und nach Apherese
Tabelle 15	Patient 1: Mittelwerte von Zellverläufen von Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil und eosinophil), Monozyten - Hk-Korrigiert
Tabelle 16	Patient 2: Mittelwerte von Zellverläufen von Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil und eosinophil), Monozyten - Hk-Korrigiert
Tabelle 17	Patient 3: Mittelwerte von Zellverläufen von Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil und eosinophil), Monozyten - Hk-Korrigiert
Tabelle 18	Patient 4: Mittelwerte von Zellverläufen von Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil und eosinophil), Monozyten - Hk-Korrigiert
Tabelle 19	Patient 5: Mittelwerte von Zellverläufen von Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil und eosinophil), Monozyten - Hk-Korrigiert
Tabelle 20	Patient 6: Mittelwerte von Zellverläufen von Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil und eosinophil), Monozyten - Hk-Korrigiert
Tabelle 21	Übersicht über bisherige Studien / AWB mit Immunopure®
Tabelle 22	Das ideale Aphereseverfahren vs. den derzeitigen Stand

Danksagung

Der größte Dank im Rahmen dieser Arbeit gilt meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Grit Waitz.

Ohne ihre außerordentliche Expertise, ihren unermüdlichen Einsatz über die vielen Jahre inkl. der nötigen Mahnungen, die Kritiken, die Ratschläge und das Korrekturlesen, hätte ich diese Arbeit nicht so vollenden können.

In diesem Rahmen möchte ich auch dem gesamten Team der damaligen Praxis für Apherese in der Rostocker Nobelstraße herzlich für Ihren Beitrag an dieser Arbeit danken.

Namentlich zu nennen ist hier Grynet Quintern für die Mitarbeit im praktischen Anteil, sowie der Demonstration und Einarbeitung in die in dieser Arbeit verwendeten Methoden.

Des Weiteren gilt meinem Dank dem ärztlichen Team der Praxis v.a. Herrn Dr. Wolfgang Ramlow und Dr. Wolfgang Prophet, die mir im Rahmen meiner damaligen Famulatur das Thema der Apherese bei Ip(a)- und CED-Patienten näher gebracht haben.

Besonders Herrn Dr. Ramlow möchte ich für die fachlichen Ratschläge, die Ideen, das Korrekturlesen und die Mitbetreuung der Promotion herzlich danken.

Des Weiteren gilt mein Dank dem betreuenden Hochschullehrer Herrn Prof. Dr. Schober für die Überlassung des Themas, die Betreuung und fachliche Unterstützung.

Mein Dank gilt außerdem den Probanden der Anwendungsbeobachtung, welche sowohl während der Anwendungsbeobachtung selbst, als auch in der Nacharbeit mir jederzeit freundlich und engagiert zur Verfügung standen. Dass alle sechs Probanden der Anwendungsbeobachtung die Teilnahme an dieser als sinnvoll und lohnenswert empfanden, bestätigt die Grundidee dieser Arbeit und hat mich sehr gefreut.

Nicht zuletzt gilt mein Dank an dieser Stelle auch meiner Familie für ständige Ermutigungen, die liebevolle Begleitung und die Mahnungen, die mir während des Anfertigens dieser Arbeit zugesprochen wurden - als auch meiner Freundin Katharina für Liebe, Korrekturen in der Kommasetzung und ihren weiteren Anteil an den von ihr mal definierten „Gelingensbedingungen“.