

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

“TECHNICAL COMPARISON OF
FOUR DIFFERENT EXTRACORPOREAL PHOTOPHERESIS SYSTEMS”

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andreas Michael Brosig

2017

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*“TECHNICAL COMPARISON OF
FOUR DIFFERENT EXTRACORPOREAL PHOTOPHERESIS SYSTEMS”*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andreas Michael Brosig

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. N. Ahrens
2. Berichterstatter:	Prof. Edward K. Geissler, PhD
Tag der mündlichen Prüfung:	13.11.2017

Inhalt

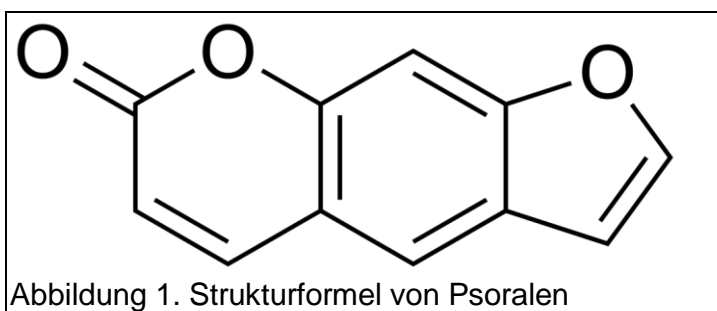
1	Einleitung.....	6
1.1	Psoralene	6
1.2	Psoralen und UVA (PUVA).....	7
1.3	Pathogeninaktivierung	7
1.4	Wirkprinzip der Photopherese	8
1.5	Indikationen der extracorporalen Photopheresetherapie.....	8
1.6	Technische Durchführung von Photopheresesystemen	9
1.6.1	Inline-Apheresesysteme	9
1.6.2	Offline-Apheresesysteme	9
2	Fragestellung.....	10
3	Eigene Arbeit.....	10
4	Diskussion der Ergebnisse.....	21
4.1	Leistungsfähigkeit der Apheresesysteme	22
4.2	Ausblick	23
5	Zusammenfassung.....	24
	Referenzen.....	25
	Danksagung	27
	Curriculum Vitae.....	28

1 Einleitung

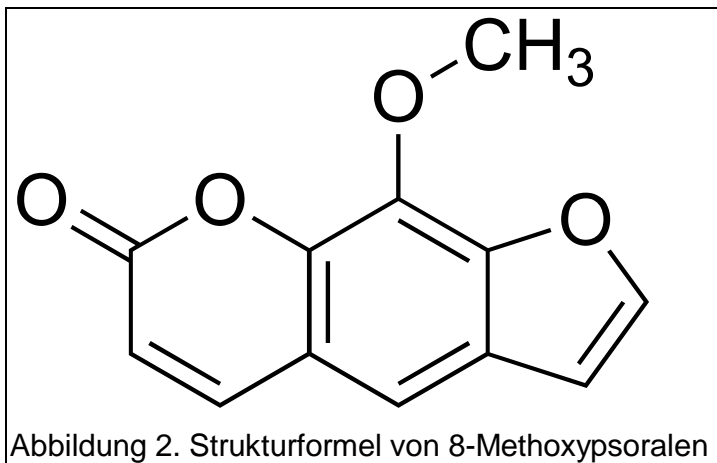
Mit der extracorporalen Photopherese (ECP) wird ein Verfahren bezeichnet, bei dem zunächst Blut gewonnen, 8-Methoxypsoralen zugegeben wird, mit UV-Licht bestrahlt und dem Patienten zurückgegeben wird (R. Edelson et al. 1987; R. L. Edelson 2014). Es basiert auf einer altägyptischen Therapie mit psoralenhaltigen Pflanzenextrakten zur Behandlung von Vitiligo, einer mit Pigmentverlust einhergehenden Hauterkrankung (El Mofty 1948). Die Entwicklung der chromatographischen Methoden insbesondere in den 1970er Jahren ermöglichten die Charakterisierung der Wirksubstanz (Gazith et al. 1978). Damit war die Voraussetzung für die Entwicklung neuer Anwendungen gegeben, insbesondere für ECP und Pathogeninaktivierung.

1.1 Psoralene

Psoralene sind Substanzen aus der Gruppe der Furocumarine, die natürlich in geringen Mengen in verschiedenen Pflanzen u.a. in Feigen, Limetten und verschiedenen Pflanzen aus dem Niltal, sowie Indien vorkommen (Berger et al. 1985) (Abbildung 1). Der Name leitet sich aus der asiatischen Hülsenfrucht *Psoralea corylifolia* ab. Diese Substanzen dienen der pflanzlichen Insektenabwehr und haben die bemerkenswerte Eigenschaft, durch UVA-Licht aktiviert werden zu können, so dass kovalente Bindungen zu Pyrimidin-Ringen und anderen Strukturen eingegangen werden können (Berger et al. 1985).



Die Substanz 8-Methoxypsoralen ist mit einer molaren Masse von 216,18 g/mol ein kleines lipophiles Molekül (Abbildung 2). Es kommt in den Pflanzen *Ammi majus* (Große Knorpelmöhre), *Heracleum candicans* (Wurzeln) und anderen vor.



Andere Psoralene sind Imperatorin, Bergapten und Amotosalen (Wollowitz 2001), welche als analytische Kontrollsubstanz, als Aromabestandteil von Earl Grey-Tee oder für die Pathogeninaktivierung verwendet werden (s.u.).

1.2 Psoralen und UVA (PUVA)

Die photosensibilisierende Eigenschaft der Psoralene wird seit Jahrtausenden für die Therapie dermatologischer Erkrankungen verwendet (Psoriasis, Atopie, Vitiligo, kutane T-Zell-Lymphome). Erste medizinische Texte erwähnen diese Therapieform um 1500 v.Chr. (Farahnik et al. 2016).

Die Anwendung ist bei bestimmten Stadien von kutanen T-Zell-Lymphomen, Psoriasis und anderen dermatologischen Erkrankungen weiterhin indiziert (Prince et al. 2009). Für die PUVA-Therapie wird 8-MOP topisch oder oral in einer Dosierung von etwa 0,5 mg/kg Körpergewicht gegeben und 75 min später UV-A Licht mit 0,5–2,5 J/cm² als Ganzkörperanwendung appliziert (Farahnik et al. 2016). Überschüssiges 8-MOP wird in den nachfolgenden 24 Stunden ausgeschieden, Langzeitwirkungen, wie z.B. kutane Malignome, sind jedoch möglich.

1.3 Pathogeninaktivierung

Die DNA-interkalierende und zellinaktivierende Wirkung der Psoralene kann für Blutprodukte verwendet werden. Plasma, Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate enthalten als wirksamen Bestandteil keine kernhaltigen Zellen. Wenn in diesen Blutprodukten DNA enthalten ist, dann stammt es von kontaminierenden Leukozyten, von Bakterien oder Viren. Die Behandlung von Thrombozytenkonzentraten oder Plasma mit Amotosalen reduziert die Infektionszahlen um 10⁵ oder mehr Logstufen und wird daher als Pathogeninaktivierung bezeichnet (Wollowitz 2001).

1.4 Wirkprinzip der Photopherese

Für die ECP-Therapie wird 8-MOP verwendet und mit folgenden Schritten durchgeführt:

- Leukozyten in Apheresetechnik aus extracorporalem Kreislauf gewinnen;
- Herstellung einer Suspension in autologem Plasma;
- Zugabe von 8-Methoxypsoralen mit einer typischen Endkonzentration von 200–340 ng/mL;
- Belichtung mit UVA in einer typischen Energiedichte von 1,5–2 J/cm²;
- Retransfusion.

Die Wirkmechanismen sind noch nicht vollständig entschlüsselt, aber neuere Arbeiten zeigen, dass bei der Photopherese Zellaktivierungsprozesse angestoßen werden, die für die Auslösung der Immunmodulation eine Rolle spielen: Thrombozyten binden an Kunststoffoberflächen und werden aktiviert, wobei Fibrinogen diesen Prozess durch Bindung über den GPII/IIIa-Rezeptor verstärkt. Über P-Selectin (CD62P) kommt es zur Interaktion so gebundener Thrombozyten mit Monozyten, die nachfolgend zu antigenpräsentierenden dendritischen Zellen reifen (Durazzo et al. 2014). Dass dieser Aktivierungsmechanismus zusammen mit der Apoptoseinduktion bei Lymphozyten einen modulierend tolerogenen Effekt im Immunsystem auslösen kann, ist beschrieben (R. Edelson et al. 1987) und wird vor dem Hintergrund der Überlegung, dass die Photopheresetherapie auch zelluläre Anti-Tumor-Aktivitäten vermitteln kann, gerade neu diskutiert (Hannani 2015).

1.5 Indikationen der extracorporalen Photopheresetherapie

Die aktuelle Fassung der “Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice“ der American Society of Apheresis (kurz ASFA-Guidelines) aus dem Jahr 2016 bewertet generell in kategorisierter Form (absteigend, Kategorie I-IV) den krankheitsbezogenen Einsatz von Aphereseverfahren und empfiehlt adaptiert an den derzeit vorliegenden Evidenzgrad welches Therapieverfahren zum Einsatz kommen sollte (Grad der Empfehlung: absteigend 1A-2C) (Schwartz et al. 2016).

Die Einsatzmöglichkeiten und Beurteilung des ECP-Verfahren nach oben beschriebem Schema wird in Tabelle 1 (nach Schwartz et al. 2016) dargestellt.

Tabelle 1. Beurteilung der Indikationen für die ECP (nach Schwartz et al. 2016)

Kategorie	Erkrankung	Grad der Empfehlung
I	Kutanes T-Zell-Lymphom, Mycosis fungoides, Sezary-Syndrom (erythroderme Form)	1B
II	Graft-versus-host disease, chronisch	1B
	Lungentransplantation, Bronchiolitis obliterans syndrom (BOS)	1B
	Graft-versus-host disease, akut	1C
III	Sklerodermie	2A
	Psoriasis	2B
	Pemphigus vulgaris	2C
	Nephrogene systemische Fibrose	2C
	M. Crohn	2C
	Kutanes T-Zell-Lymphom, Mycosis fungoides, Sezary-Syndrom (nicht erythroderme Form)	2C
	Atopisches Ekzem	2C
IV	Dermatomyositis	2C

1.6 Technische Durchführung von Photopheresesystemen

1.6.1 Inline-Apheresesysteme

Inline-Apheresesysteme zeichnen sich durch ein Bauprinzip aus, das Zellseparator und Bestrahlungseinheit in einem Gerät vereint. Dies ermöglicht eine einfache integrierte Bedienung aller Vorgänge und ein geschlossenes System, da die Retransfusion nach UVA-Belichtung durch eingebaute Pumpen erfolgt.

Das erste Inline-Apheresesystem „UVAR“ der Firma Therakos zur Durchführung der ECP wurde 1988 von der FDA zugelassen - initial zur Therapie des Sezary-Syndroms. 1998 wurde der Nachfolger UVAR XTS eingeführt, und die letzte Weiterentwicklung CELLEX stellt seit 2007 die aktuellste Variante des Inline-Apheresesystems dar.

1.6.2 Offline-Apheresesysteme

Bei Offline-Apheresesystemen wird ein Zellseparator (z.B. Spectra Optia, TerumoBCT oder Amicus, Fresenius) zur Gewinnung des Leukapheresates in Kom-

bination mit einem separaten Bestrahlungsgerät (z.B. PUVA Combi Light oder Macogenic G/G2) eingesetzt.

Die gezielte Konfiguration der einzelnen Geräte ermöglicht eine sehr flexible Umsetzung des ECP-Verfahrens um z.B. die Therapiedurchführung bei Patienten mit niedrigem Gesamtblutvolumen zu ermöglichen. Da das gewonnene Leukapheresat für den Bestrahlungsvorgang vom Patienten getrennt werden muss, gelten hohe Anforderungen an die Identitätskontrolle und -sicherung. Darüberhinaus sind übergeordnet lokal regulatorische Vorgaben von Regierungen und (Bundes-)Behörden, die eine Einstufung der Offline-Verfahren als Arzneimittelherstellung vornehmen, gesondert zu beachten, was auch in einer aktuellen Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie bewertet wird (Pannenbecker 2016).

2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist eine vergleichende Darstellung von vier unterschiedlichen technischen Systemen, die für die Durchführung der extracorporalen Photopheresetherapie (ECP) am Universitätsklinikum Regensburg eingesetzt werden. Im Wesentlichen lassen sich Photopheresesysteme nach der Art der Therapiedurchführung in Offline-Systeme (Amicus, Cobe Spectra, Spectra Optia) und Inline-Systeme (Therakos UVAR XTS) einteilen. Der Einfluss der Apheresegeräte auf die Zellzusammensetzung der Leukapheresate soll mit unterschiedlichen Methoden beurteilt werden. Für die Messung von Zellzahlen wurde ein Sysmex XE5000 und für durchflusszytometrische Bestimmung von zellulären Oberflächenmerkmalen ein BD FACS Canto eingesetzt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel, sowie R.

3 Eigene Arbeit

Die vergleichende Untersuchung unterschiedlicher Photopheresesysteme wurde in der Zeitschrift Transfusion publiziert (Brosig et al. 2016).

Technical comparison of four different extracorporeal photopheresis systems

Andreas Brosig,^{1†} Viola Hähnel,^{1†} Evelyn Orsó,¹ Daniel Wolff,²
Ernst Holler,² and Norbert Ahrens¹

BACKGROUND: Extracorporeal photopheresis (ECP) is a therapeutic technique that combines leukapheresis and ultraviolet (UV)A irradiation of the leukapheresate after 8-methoxypsoralen treatment with subsequent retransfusion. It can be achieved with a single device (online) or by combining an apheresis machine with a separate UVA light source (offline). The comparability of both established methods is unknown.

STUDY DESIGN AND METHODS: In a prospective setting, four ECP systems were evaluated: one with integrated UVA irradiation for online ECP (Therakos) and three with external UVA irradiation for offline ECP (Amicus, Optia, and Cobe Spectra). Apheresis variables and cell counts were determined by methods including flow cytometry.

RESULTS: The duration of apheresis ranged from 120 minutes (Amicus, Optia) to 275 minutes (Therakos). Mononuclear cell (MNC) counts in the treatment bags were comparable between offline ECP methods (median, $57 \times 10^8 - 66 \times 10^8$) and lower for online ECP (14×10^8). CD16+ monocytes were abundant in online ECP (82%) but rarer in offline ECP (median, 14% – 19%). Hematocrit ranged from 0.1% (Therakos) to 8% (Amicus). There were no side effects in any patients.

DISCUSSION: All offline ECP systems studied yielded comparable cellular compositions and highly enriched populations of MNCs. In contrast, white blood cells from online ECP displayed enrichment of nonclassical monocytes. The relevance of these findings is unknown as there is no established biomarker to predict the therapeutic efficacy of these procedures.

Extracorporeal photopheresis (ECP) is an efficient and established therapy for cutaneous T-cell lymphoma, graft-versus-host disease, rejection after solid organ transplantation, and various autoimmune diseases.^{1,2} It is based on the ex vivo treatment of autologous leukapheresates with 8-methoxypsoralen (8-MOP), subsequent UV irradiation, covalent DNA strand linkage by 8-MOP, and retransfusion. This prevents transcription and replication, leading to cell inactivation.³

There are two basic ways to perform ECP. The so-called online method (by Therakos) combines cell collection, UVA irradiation, and retransfusion of the treated cells in a single closed system. The second is an offline method, in which a leukapheresate collected using an apheresis cell separator is treated by UVA irradiation within a separate device. The clinical efficacy of both methods is well established,⁴ but no direct comparison of the process characteristics of the two methods has been carried out to date. In this study, we compared four

ABBREVIATIONS: 8-MOP = 8-methoxypsoralen; CE(s) = collection efficiency(-ies); cMNC(s) = continuous mononuclear cell collection(s); ECP = extracorporeal photopheresis; TP(s) = collection throughput(s).

From the ¹Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; and ²Department of Hematology and Oncology, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany.

Address reprint requests to: PD Dr Norbert Ahrens, University Hospital Regensburg, Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany; e-mail norbert.ahrens@ukr.de.

[†]These authors contributed equally to this project and should be considered co-first authors.

Received for publication February 1, 2016; revision received May 19, 2016; and accepted May 31, 2016.

doi:10.1111/trf.13728

© 2016 AABB

TRANSFUSION 2016;56:2510–2519

photopheresis systems—the Therakos Uvar XTS system for online photopheresis and the Spectra Optia (Optia), Cobe Spectra (both Terumo BCT), and Fresenius Kabi Amicus apheresis systems in combination with the Cellmax PUVA Combi-Light UVA Illuminator for offline ECP—with regard to content of therapeutically relevant cells as well as key process and performance characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Patients

ECP process validation was carried out according to the EU Guidelines for Good Manufacturing Practice.⁵ All participants gave their informed consent and received either online or offline ECP as medically indicated. Treatment was performed on 2 consecutive days per treatment cycle. This study protocol was approved by the local ethics committee (16-101-0100).

Treatment protocol

Online ECP was carried out with the Therakos (West Chester, PA) Uvar XTS photopheresis system. The bowl size (125 or 225 mL) and number of treatment cycles were chosen according to the patient's total blood volume and hematocrit (Hct). Heparin was used for anticoagulation.

For offline ECP, apheresis was carried out with the Cobe Spectra (Terumo BCT), Spectra Optia (Terumo BCT), or Amicus (Fresenius Kabi) apheresis system. ACD-A was used for anticoagulation, and the patients were supplemented with calcium as needed. All offline ECP procedures were set up to yield leukapheresate and plasma volumes of 90 and 110 mL, respectively, after cell harvesting.

With the Cobe Spectra, we used the AutoPBSC protocol, which operates in cycles and allows for direct entry of data on the processed blood volume. Cells were collected in six cycles with a 3-mL harvest volume and 12-mL plasma flush volume (equaling 15 mL per cycle), with 110 mL of additional plasma.

With the Optia, the continuous mononuclear cell collection (cMNC) protocol was implemented using the new IDL tubing set, which collects WBCs continuously. Adjustment of the total processed volume was achieved by entering the processed blood volume and calculating the anticoagulant volume. The machine was set up to collect 1.2% of the processed blood.

The Amicus was used in MNC mode, which operates in cycles. The processed volume results from five treatment cycles with 1375-mL cycle volume each, the addition of the blood volume required for plasma collection (approx. 600 mL depending on the patient's Hct), and final chamber flushing (50-100 mL). Offsets for MNCs and red

blood cells (RBCs) were 2.3 and 6.0, respectively; each buffy coat collection was flushed with 10 mL of additional plasma.

In all offline ECP treatments, leukapheresate and plasma were combined. The resulting 200-mL sample was transferred to a UV-permeable ethylene vinyl acetate bag (Cellmax), samples for cellular analytics were drawn, and 2 mL of 8-MOP 20 mg/L (8-MOP, Uvadex, Therakos) was added (final 8-MOP concentration before irradiation, 200 ng/mL). Subsequently, UVA radiation (2 J/cm²) was delivered with the PUVA Combi-Light UVA illuminator (320-370 nm, Cellmax). The treated cell suspension was then immediately administered to the patient.

Analytics

Cell count

Cellular concentrations were measured on a hematology analyzer (XE-5000, Sysmex). Cell suspension samples (50 μ L) were prediluted in capillary tubes (Sysmex) with 200 μ L of buffer (Cellpack, Sysmex).

Flow cytometry

Immunophenotyping of white blood cells (WBCs) was performed with commercially available antibodies: CD14-APC, CD3-PerCP, CD56-PE, CD22-PE, CD19-APC, and HLA-DR-FITC from BD Biosciences; CD16-FITC, CD45-APC, CD10-FITC, CD16-PE, and CD33-PE from Beckman Coulter; and CD45-PerCP from DAKO. Lysis of RBCs was performed by using FACS lysing solution (BD). Flow cytometric analysis was performed with a flow cytometer (BD FACSCanto II, BD Biosciences). All cells were gated from CD45+ cells—i.e., T cells (CD3+ FSC and SSC low), classical monocytes (CD33+ CD14+ CD16– FSC and SSC dim), and nonclassical monocytes (CD33+, CD14+ CD16+ FSC, and SSC dim)⁶—as displayed in Fig. 1.

Statistical analysis

Data were analyzed using computer software (Excel 2010, Microsoft Corp.) and R to calculate minimum, median, and maximum values; the Shapiro-Wilk test for normal distribution; and the Kruskal-Wallis test and one-way analysis of variance for significance. Figures were generated as boxplots with nonrandom jitter scatter plots (beeswarm boxplots) by combining R's built-in boxplot method with the beeswarm package from Aron Eklund. Heatmaps were made using the gplots package from Gregory R. Warnes and colleagues.

Total blood volume was calculated using Nadler's formula. Collection efficiency (CE) and collection throughput (TP) were calculated according to the formulas

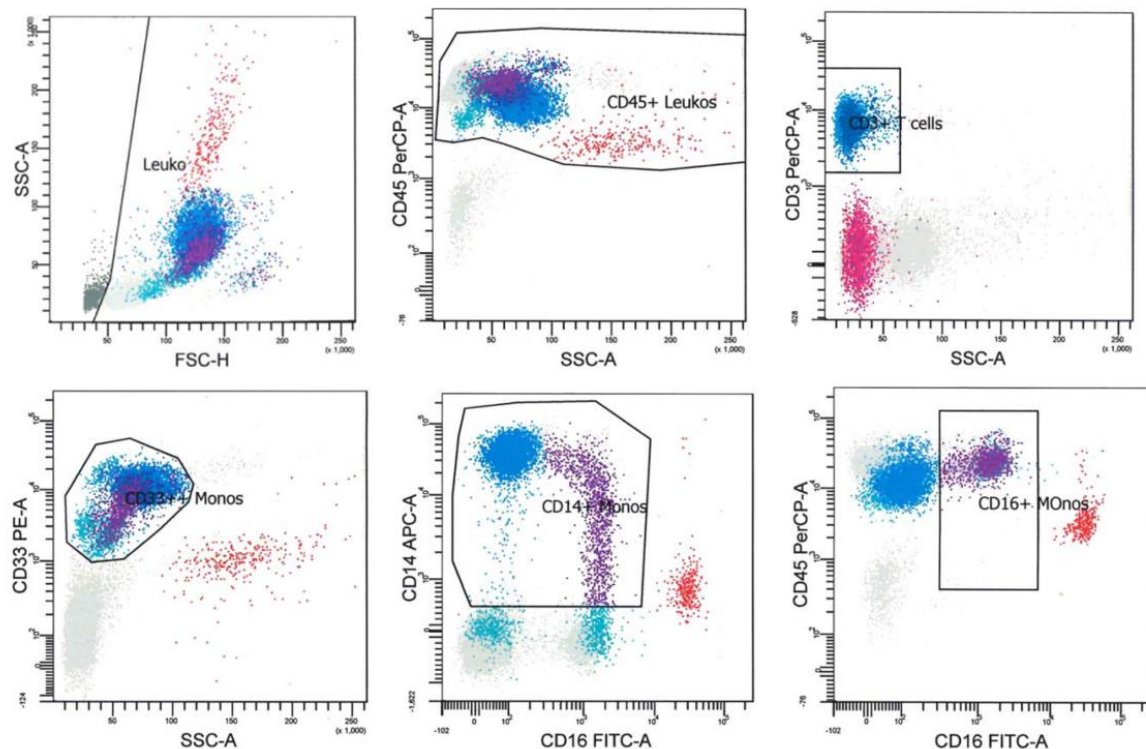


Fig. 1. Flow cytometric gating strategy of photopheresis cell suspensions considering T-cells, WBCs (Leukos), and monocytes (Monos).

$$CE = \frac{\text{Cell concentration apheresate} \times \text{Volume apheresate}}{\frac{\text{Cell concentration venous before} + \text{Cell concentration venous after apheresis}}{2} \times \text{Blood volume processed}}$$

$$TP = \frac{\text{Cell concentration apheresate} \times \text{Volume apheresate}}{\frac{\text{Cell concentration venous before} + \text{Cell concentration venous after apheresis}}{2} \times \text{Length of apheresis}}$$

RESULTS

Patients

A total of 107 procedures in 31 patients were included in the analysis (Table 1). Median age was 52 years in the overall population and 64 years in the Therakos group. Patients were assigned to one or several of the ECP methods based on medical indication and anatomical constraints. With Therakos being the only single arm method available, it was thus applied more frequently for aged patients. In addition, extracorporeal volume constraints limit the applicability of online ECP in children as for the patient in the presented data weighing 48 kg—a factor that also increased the median age of the Therakos group.

None of the investigated ECP methods produced any side effects in the patients.

Online ECP also differed in terms of the peripheral platelet (PLT) count. Therakos-treated patients had significantly higher PLT counts (median, 312/nL compared to 232/nL for the overall population; $p < 0.03$) and lower hemoglobin (Hb) values (10.4 g/dL compared to 12.0 g/dL for the overall population; $p < 0.02$). WBCs and the percentages of neutrophils, lymphocytes, and monocytes in peripheral blood did not differ significantly between online and offline ECP, however.

Treatment procedure

The duration of apheresis ranged from 120 to 275 minutes (Table 2). It was shortest with Optia cMNC and longest

TABLE 1. Patient characteristics*

Characteristics	Amicus	Cobe Spectra	Spectra Optia	Therakos	Overall
Number of patients	12	22	7	10	31
Male/female (% males)	75	55	43	50	52
Age† (years)	53 (17-69)	51 (17-69)	48 (17-59)	64 (19-76)	52 (17-76)
Total blood volume† (L)	5.2 (3.8-6.6)	5.0 (3.1-6.6)	4.6 (3.7-5.7)	4.7 (3.5-7.2)	4.9 (3.1-7.2)
Diagnoses					
Acute GVHD	2	7	3	4	16
Chronic GVHD	8	25	5	10	48
Sézary's disease	3	9	2		14
Atopy	2	4		3	9
Scleroderma		2		4	6
Collagenosis		1	1		2
Crohn's disease	1	1			2
Bronchiolitis obliterans after lung transplantation		5	1	4	10
Treatments	16	54	12	25	107
Included treatments per patient	1 (1-2)	2 (1-6)	2 (1-3)	2 (1-6)	3 (1-8)
Full blood count before apheresis					
WBCs ($\times 10^9/L$)	6.0 (2.4-12.2)	6.4 (2.1-13.0)	4.1 (2.8-10.0)	5.8 (3.0-14.3)	5.8 (2.1-14.3)
Hb† (g/dL)	12.4 (9.0-15.1)	12.1 (7.7-15.3)	12.1 (9.4-14.3)	10.4 (8.4-15.0)	12.0 (7.7-15.3)
Hct† (%)	36 (27-44)	36 (25-44)	36 (29-40)	33 (26-43)	36 (25-44)
Thrombocytes† ($\times 10^9/L$)	216 (76-451)	218 (26-574)	181 (76-327)	312 (33-693)	232 (26-693)
Neutrophils (%)	71 (22-88)	67 (25-91)	66 (47-87)	70 (52-93)	68 (22-93)
Lymphocytes (%)	16 (2-51)	17 (2-47)	16 (2-32)	15 (5-32)	16 (2-51)
Monocytes (%)	11 (4-24)	11 (1-23)	13 (10-23)	10 (1-27)	11 (1-27)

* Data are expressed as median (range). Results in right column ("Overall") include patients who received more than one ECP treatment method.

† Variables with significantly different distributions ($p < 0.05$).

GVHD = graft-versus-host disease.

with Therakos Uvar XTS. In the latter case (online ECP), this included the time for irradiation and retransfusion, which generally took 15 to 30 minutes for offline ECP. The leukapheresis bag volumes showed similar differences: they were largest with Therakos Uvar XTS (Table 2) and comparable between the offline ECP systems as a result of their identical apheresis variable settings. Processed blood volumes with the Cobe Spectra had an extended range (2.8-11.7 L), because this machine was used also in children and in acute cases requiring high-volume ECP. Processed volumes were obtained with mean flow rates of 54 mL/min (Cobe Spectra), 50 mL/min (Optia), and 48 mL/min (Amicus). The apheresis volumes of Therakos Uvar XTS treatments could not be determined.

Cell composition

Although the patients had comparable peripheral WBC counts, the WBC yields in the apheresis bags differed significantly between the offline and online ECP systems (Fig. 2). The median total WBC content was 73×10^8 , 66×10^8 , and 63×10^8 with Amicus MNC, Cobe Spectra AutoPBSC, and Optia cMNC, respectively, versus 30×10^8 with Therakos Uvar XTS ($p < 0.000004$). The total WBC content is largely influenced by the processed blood volume, while CE and TP are not.

The median WBC CEs of Amicus MNC, Cobe Spectra AutoPBSC, and Optia cMNC was 16, 12, and 20%,

respectively. That of Therakos Uvar XTS could not be determined as the processed blood volume is unknown.

In general, CE for MNC was much higher than CE for all WBC combined, indicating selectivity for these cells. The median CEs for MNC were 60, 50, and 60% with Amicus MNC, Cobe Spectra AutoPBSC, and Optia cMNC, respectively (Fig. S1a, available as supporting information in the online version of this paper). This indicates that the newer apheresis devices (Amicus and Optia) harvest 60% of the MNCs processed, while 40% reenter the patient's circulation immediately. The median TPs for MNC were 30, 28, 33, and 5.9 mL/min, with Amicus MNC, Cobe Spectra AutoPBSC, Optia cMNC, and Therakos Uvar XTS, respectively. Thus, MNC collection was slowest with Therakos Uvar XTS and fastest with Optia cMNC. Relative and total MNC contents were 97.2% and 66×10^8 , 96.8% and 57×10^8 , 99.8% and 57×10^8 , and 52.9% and 14×10^8 with Amicus MNC, Cobe Spectra AutoPBSC, Optia cMNC, and Therakos Uvar XTS, respectively. MNC enrichment comprised both lymphocytes and monocytes (Fig. 3), and all methods yielded higher lymphocyte than monocyte fractions.

Additional differences were seen after flow cytometric phenotyping. Medians of 17, 19, and 14% of the monocytes from offline ECP were CD16+, compared to a median of 82% of those from online ECP. This equals 5.9% to 18.9% CD16+ monocytes based on CD45+ cells (Fig. 4). As no phenotyping from peripheral blood was available,

TABLE 2. ECP procedure data*

Procedure parameter	Amicus	Cobe Spectra	Spectra Optia	Therakos	Overall
Procedure time†‡ (min)	166 (120-245)	160 (123-195)	140 (120-193)	192 (155-275)	164 (120-275)
Volume of apheresate† (mL)	200 (183-208)	200 (150-233)	197 (195-200)	268 (207-342)	200 (150-342)
Processed volume† (L)	7.9 (7.8-8.0)	8.3 (2.8-11.7)	7.5 (6.9-7.6)	NA	7.9 (2.8-11.7)
Anticoagulation rate†	1:11.4 (11.1-12.3)	1:10.3 (7.8-11.2)	1:11.0 (9.6-11.0)	NA	1: 10.9 (7.8-12.3)
WBC CE (%)	16 (6-44)	12 (1-47)	21 (4-38)	NA	14 (1-47)
MNC CE (%)	60 (41-86)	50 (10-88)	60 (41-81)	NA	54 (10-88)
WBC throughput (mL/min)	7 (2-23)	7 (0.7-26)	11 (2-19)	3 (0.07-5)	7 (0.07-26)
MNC throughput (mL/min)	31 (19-38)	28 (2-46)	33 (16-45)	6 (0.2-9)	27 (0.2-46)

* Data are expressed as median (range).

† Variables with significant differences ($p < 0.05$).

‡ Procedure time using the specified apheresis device (including UV irradiation and retransfusion time for Therakos).

NA = not available.

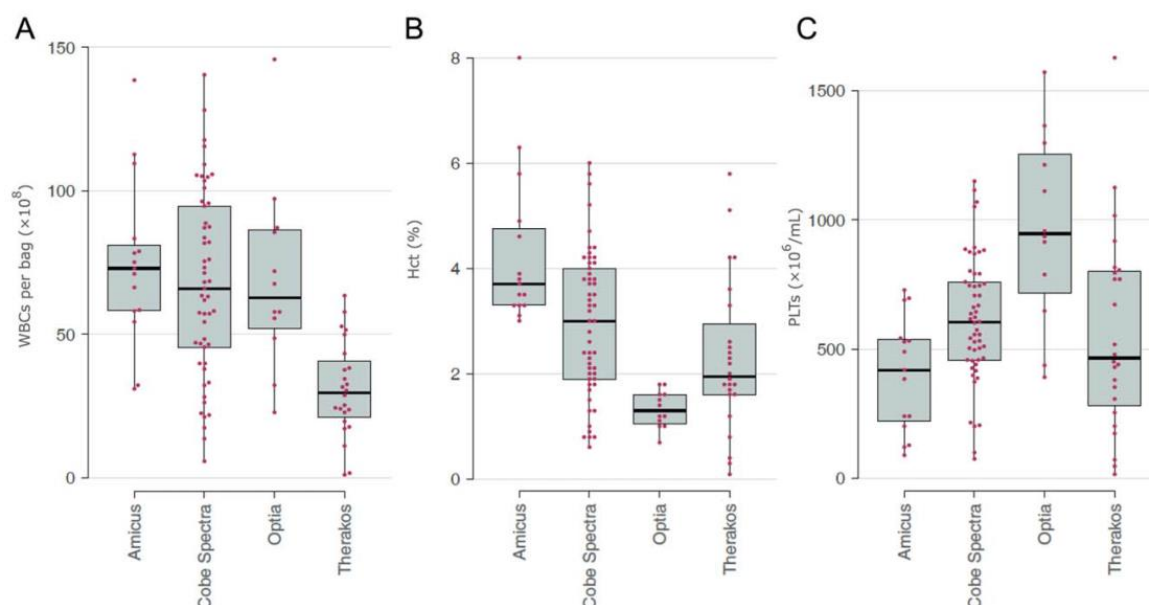


Fig. 2. Box- and beeswarm plots of WBC content (A), Hct (B), and PLT concentration (C) in photopheresis cell suspensions.

patient-specific factors cannot be ruled out as a possible explanation. No relevant further differences were seen in the other investigated cell types (HLA-DR+ CD3+, CD22+ CD19+, CD10+ CD19+, CD16+ CD56+, HLA-DR+ CD16+ CD56+).

The harvesting of MNCs was partly related to the concomitant collection of RBCs (Fig. S1b). Hct and MNC concentrations were measured after dilution of the 90-mL apheresate with 110 mL of autologous plasma. There was an inverse relationship for the Cobe Spectra that collected lower MNC concentrations in procedures with higher collection Hcts.

Hct in the apheresis bag showed median values of 3.7, 3.0, 1.3, and 1.9% for Amicus MNC, Cobe Spectra AutoPBSC, Optia cMNC, and Therakos Uvar XTS, respectively (Fig. 2). The first two methods resulted in

higher Hct values and operate in cycles. The lowest Hct values with the least variation were obtained with the Optia cMNC due to its capacity to continuously monitor the interface between plasma and the cellular content in the centrifuge.

PLTs are a possible mediator of immune activation. PLT counts found with the Amicus MNC, Cobe Spectra AutoPBSC, Optia cMNC, and Therakos Uvar XTS differed significantly with values of 419×10^9 , 605×10^9 , 947×10^9 , and 465×10^9 /L, respectively ($p < 0.0005$, Fig. 2).

Method comparison

The medians of treatment process and cell composition variables were combined in a heatmap to visualize differences and/or similarities between the four ECP methods

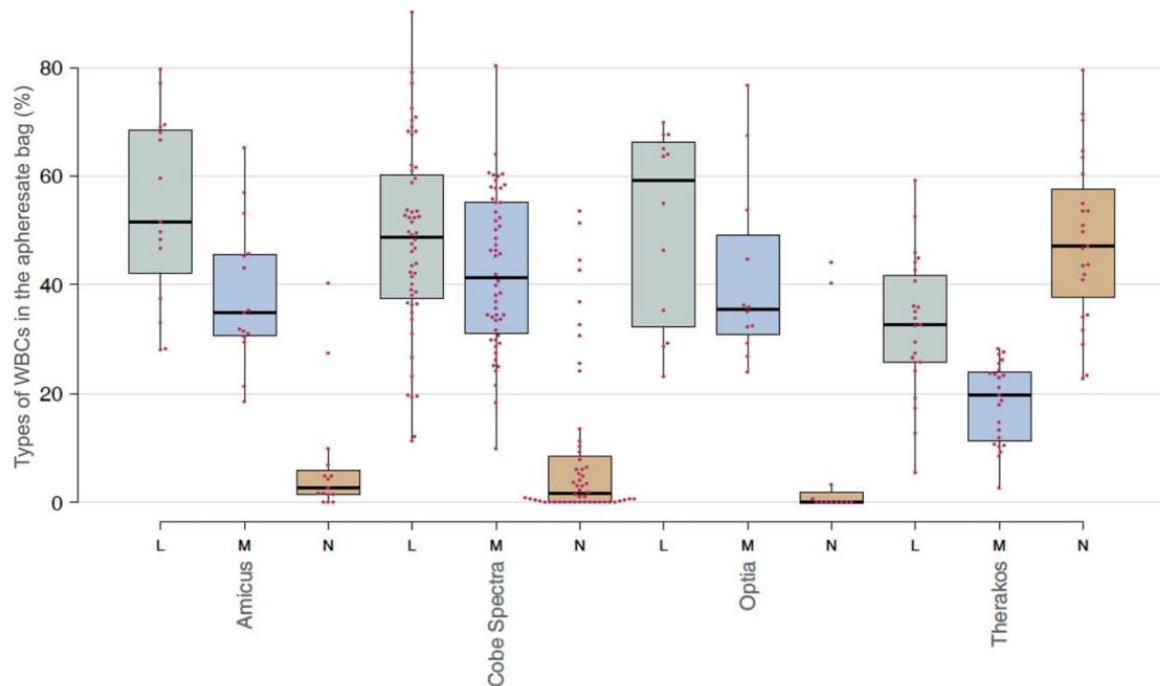


Fig. 3. Lymphocyte (L), monocyte (M), and neutrophil (N) content in photopheresis cell suspensions as percentage of WBCs.

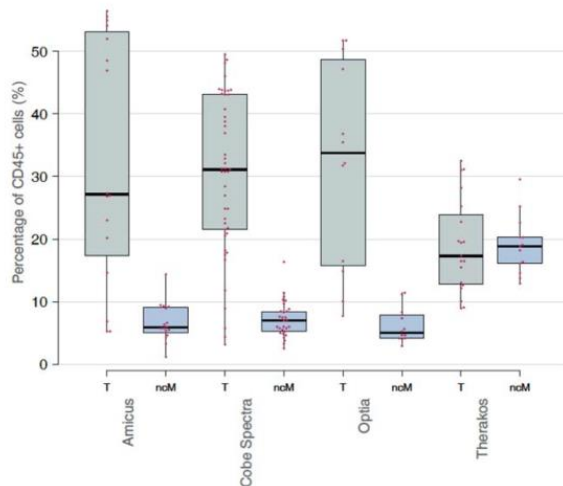


Fig. 4. CD3+ T cell (T) and CD14+ CD16+ nonclassical monocyte (ncM) content in photopheresis cell suspensions as percentage of CD45+ cells.

(Fig. 5). The dendrogram plot of all normalized variables processed illustrates the similarity of ECP leukapheresis between Cobe Spectra AutoPBSC and Amicus MNC (both of which operate in cycles) as well as Optia cMNC. This cluster analysis separates Therakos Uvar XTS, which uses traditional Latham bowl technology.

Regarding the standard deviation (SD) of the same variables, similarities between Therakos Uvar XTS, Amicus MNC, and Cobe Spectra AutoPBSC were observed. The analysis separated the newest of these methods, Optia cMNC, from the others: continuous buffy coat monitoring and flow adjustment result in less variability, which may explain the separation.

DISCUSSION

The total WBC counts for the investigated offline ECP methods had median values of 63×10^8 to 73×10^8 cells and were generally comparable to the results published by other groups (Table 3). Counts differed especially for the Cobe Spectra AutoPBSC procedure. This can, at least in part, be attributed to inhomogeneity of the patient population, which comprised patients with difficult venous access and low body weight. In fact, the procedure with the lowest total WBC count (6×10^8 WBCs) had only 48% MNCs and was from a patient with a body weight of 48 kg.

As treatment assignments were based on technical and medical aspects, patients were unevenly distributed. Technical constraints included the high extracorporeal volume of 220 to 620 mL for Uvar XTS¹⁰ and its capability to perform single-needle apheresis. Therefore, patients treated with the online method were older and had lower Hb values. In addition, no patient with Sézary's disease was treated by online ECP. This limits data interpretation.

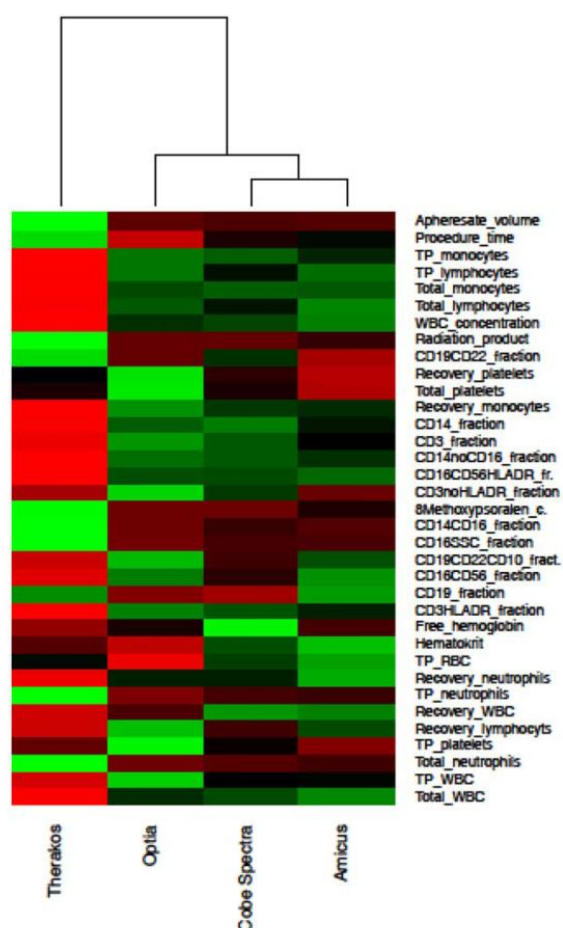


Fig. 5. Heatmap of medians of apheresis variables in online (Therakos) and offline ECP methods (Cobe Spectra, Spectra Optia, and Amicus). The method-specific deviation from the average is coded in red for lower and in green for higher values.

Varying WBC yields may, apart from patient factors, rely on technical differences. Cycle-based operation mode and storage of the collected cells within the tube centrifugation chamber harbors the risk that changes in the patient's central venous pressure could be transmitted to the apheresis chamber, causing a spillover of buffy coat and, thus, a partial loss of collected cells. In fact, variation of the cycle-based devices groups them together by cluster analysis.

Some groups obtained considerably higher counts with the Cobe Spectra and AS.TEC MNC programs (Table 3).^{9,10,15} Of course, the comparison of means is of limited value in samples lacking normal distribution (Shapiro-Wilk *p* value of 0.03 for our data). In the French studies,^{10,15} the patients had higher peripheral

WBC counts (maximum $32 \times 10^9/L$, mean $8.6 \times 10^9 - 10.4 \times 10^9/\mu L$), and larger volumes were processed. The German group of Erlangen⁹ also processed larger volumes; in addition, they tested the procedure in healthy blood donors, not patients.

All offline ECP procedures result in higher numbers of treated WBCs than online ECP (Table 3). Mean WBC counts for online procedures are reported to range from 20×10^8 to 63×10^8 ; our results (31×10^8) are therefore in line with the published data.¹⁰ The lower cell counts obtained with online ECP can be explained by the use of a different apheresis principle, which typically processes a fraction of the volume of other devices. However, there is no defined threshold for successful ECP. WBC doses as low as 3.4×10^8 have been reported to be clinically successful.²¹ The fact that clinical differences between the two treatments are not apparent^{4,22} indicates that additional factors may be of relevance. This does not exclude a dose effect. The Milan group reported an association between MNC count and therapeutic response.²³ However, the causality remains unclear as patients with a better prognosis tend to have higher cell counts in their ECP apheresates.

In apheresis for ECP, the MNC CE is considerably superior to that for WBC collection in general (Table 2, CE of 54% vs. 15%, respectively). In particular, the newer devices Amicus and Optia achieved median MNC fractions of 97.2 and 99.8%, respectively. On the other hand, the online ECP device mostly resulted in much lower MNC fractions.

PLTs are one of the immune constituents able to activate monocytes and stimulate dendritic cell development, which may be of relevance in ECP therapy.²⁴ Apheresates obtained with Therakos Uvar XTS, Cobe Spectra, or Optia had higher PLT counts than with Amicus and were in the order of those of PLT concentrates. Photopheresis with continuous flow and high centrifugation force may result in even higher values.⁹

The nonclassical monocyte phenotype with CD16+ expression was found in 82% of samples from the online ECP compared to only 14% to 19% of those from the offline ECP apheresis devices. This could be relevant for treatment efficacy as activated (CD14+ CD16+) monocytes may achieve superior antigen presentation.²⁵ However, these data were obtained before UV irradiation and might therefore differ upon retransfusion. Interpretation is limited somewhat because monocyte differentiation was not available from peripheral blood. Monocytes have a fast activation capacity. Therefore, it is unclear if the monocytes were already activated before treatment and selected by apheresis, or if they were activated by the apheresis process itself, for example, by heparin that was used for anticoagulation in online ECP, but not in offline ECP that used ACD-A instead. Other markers of activation apart from CD16 that respond slower—like HLA-DR expression—did not differ between online and offline ECP.

TABLE 3. Published data on ECP and comparable procedures: performance data with contents of the treatment bags*

Method	WBCs ($\times 10^8$)	MNCs	RBCs†	PLTs ($\times 10^{11}$)
Amicus				
MNC ⁷	57‡	NA	4.6 (SD 2.1) mL	0.5 (SD 0.3)
MNC ⁸	59 (SD 12)§	68%	9.6% (SD 2.6%)	0.5 (SD 0.1)
MNC ^{MS}	75 (SD 29; 31-139)	92% (SD 11%; 59%-100%)	4.3% (SD 1.4%; 3.05-8.0%)	0.8 (SD 0.4; 0.2-1.4)
AS.TEC 204 (%)				
CP 129 ⁹	89 (SD 45)	93% (SD 7%)	NA	1.9 (SD 1.2)
CP 194 ⁹	152 (SD 35)	96% (SD 3%)	NA	6.3 (SD 1.2)
Cobe Spectra ¹⁰	159 (SD 97)	96%‡	0.95-1.2%	NA
AutoPBSC ¹¹	66‡	NA	3.4 (SD 1.9) mL	1.5 (SD 0.7)
AutoPBSC ^{MS}	66 (SD 32; 6-140)	91% (SD 14%; 46%-100%)	3.0% (SD 1.4%; 0.65%-6.0%)	1.2 (SD 0.5; 0.1-2.2)
MNC ⁷	65 (0.65-23.8)	85% (41%-98%)	1.4% (0.1%-8%)	2.1 (0.04-7.8)
MNC ¹²	84 (SD 6)	NA	3.7 (SD 0.2) mL	NA
MNC ¹³	54‡	87% (47%-96%)	4.7% (median; 25%-13%)	4.1 (median; 1-8.9)
MNC for acute GVHD ¹⁴	NA	69% (SD 20%)	3.6% (0.25%-19.5%)	NA
MNC for chronic GVHD ¹⁴	NA	77% (SD 16%)	2.4% (0.25%-17.5%)	NA
MNC SF 250 ⁹	89 (SD 21)	99% (SD 1%)	NA	1.6 (SD 0.8)
MNC SF 500 ⁹	121 (SD 35)	93% (SD 7%)	NA	3.6 (SD 0.6)
MNC (2 hr) ¹⁵	159 (SD 97; 15-480)	96%‡	NA	NA
MNC (3 hr) ¹⁵	220 (SD 160; 37-718)	98%‡	NA	NA
MNC ¹⁶	52 (IQR 38-78)	94% (IQR 86%-97%)	2.4% (IQR 1.2%-3.7%)	1.2 (IQR 0.7-1.7)
COM.TEC				
autoMNC ¹⁷	38 (SD 18; 6-68)	92% (SD 7%; 75%-100%)	12% (SD 2%; 5%-17%)	NA
autoMNC ⁸	65 (SD 16)§	69%	8.5% (SD 2.5%)	6.1 (SD 1.4)
Spectra Optia				
cMNC ^{MS}	69 (SD 33; 23-146)	92% (SD 16%; 55%-100%)	1.3% (SD 0.3%; 0.7%-1.8%)	1.8 (SD 0.7; 0.7-2.9)
MNC ¹⁶	73 (IQR 45-103)	96% (IQR 94%-97%)	3.3% (IQR 2%-4.8%)	2.4 (IQR 1.4-3.5)
MNC ¹²	88 (SD 6)	NA	3.1 (SD 0.2) mL	NA
MNC ⁸	57 (SD 19)§	70%	3.1% (SD 0.71%)	1.1 (SD 0.5)
Therakos				
Cellex ¹⁸	46	~65%	2.1% (SD 1.0%)	NA
Cellex ¹⁹	NA	42%	NA	NA
Cellex ²⁰	NA	35% (12%-98%)	NA	NA
Uvar ¹⁰	34 (SD 6.7)	59%‡	3.6% (SD 0.9%)	NA
Uvar XTS ¹⁵	63 (SD 34; 17-171)	68%‡	NA	NA
Uvar XTS ¹⁰	28 (SD 16)	39%	2.0% (SD 0.6%)	NA
Uvar XTS ¹⁸	20	~41%	1.2% (SD 2.0%)	NA
Uvar XTS ¹⁹	NA	21%	NA	NA
Uvar XTS ²⁰	NA	27% (8.6%-66%)	NA	NA
Uvar XTS ^{MS}	31 (SD 16; 1-63)	51% (SD 16%; 20%-77%)	2.3% (SD 1.4%; 0.1%-5.8%)	1.5 (SD 1.0; 0.05-4.5)

* Published ECP data and leukapheresis results expressed as mean with range in parenthesis unless otherwise indicated; listed in alphabetical order of first authors followed by data from the presented study (^{MS}).

† RBCs as Hct, expressed as percentage or RBC volume per treatment bag in milliliters.

‡ Calculated based on publication data.

§ CD45+ cells.

|| Calculated from CD3+ and CD14+ cells.

IQR = interquartile range; NA = not available.

Generally, RBCs shed UV light from WBCs, and therefore dosage adjustments are sometimes required. A Hct level higher than 2% may compromise the effectiveness of UVA irradiation.²⁶ While the online system has the capacity to compensate for this, the offline systems generally do not. Varying RBC contamination might therefore affect the predictability of the ECP process. Cobe Spectra AutoPBSC and Amicus MNC resulted in higher Hct values and more variation because their cycle-based harvesting processes cannot be monitored or adjusted as easily during an ECP session.

In addition, product contamination with RBCs might impair MNC yield in Cobe Spectra AutoPBSC procedures. We found an inverse relationship between product Hct

and MNC concentration for this method. This is plausible, as buffy coat recognition was based on optical density. Spillover RBCs might therefore irritate the concentration monitor and cause premature collection valve openings and closings, thus reducing MNC collection efficacy.

Online and offline ECP principles differ occasionally in their handling but provide safe procedures for ECP; it seems that they may be interchanged and adapted to the needs and requirements of the individual patient without compromising the clinical outcome.^{4,22} Our study highlights various differences as well as similarities between the four ECP systems (Fig. 5). Nevertheless, we cannot definitively conclude what factors are crucial for successful ECP in clinical practice. For the future, we suggest the

initiation of a prospective randomized clinical study examining correlations between the cellular content of leukapheresates harvested with different cell separators and clinical outcomes in a clearly defined group of patients.

ACKNOWLEDGMENTS


The help and support of the apheresis operators and physicians who conducted the photopheresis procedures and the flow cytometry team who assisted in data collection at the Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine of the University Hospital Regensburg is very much appreciated.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest.

REFERENCES

- Schwartz J, Winters JL, Padmanabhan A, et al. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice—evidence-based approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: the sixth special issue. *J Clin Apher* 2013;28:145-284.
- Marques MB, Adamski J. Extracorporeal photopheresis: technique, established and novel indications. *J Clin Apher* 2014; 29:228-34.
- Wollowitz S. Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. *Semin Hematol* 2001;38:4-11.
- Hautmann AH, Wolff D, Hahn J, et al. Extracorporeal photopheresis in 62 patients with acute and chronic GVHD: results of treatment with the COBE Spectra System. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:439-45.
- European Commission. The rules governing medicinal products in the European Union — EudraLex, Volume 4. Good manufacturing practice (GMP) Guidelines [Internet]. Brussels: EudraLex; 2016 [cited 2016 May 19]. Available from: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm.
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116: e74-80.
- Perotti C, Torretta L, Viarengo G, et al. Feasibility and safety of a new technique of extracorporeal photochemotherapy: experience of 240 procedures. *Haematologica* 1999;84: 237-41.
- Steininger PA, Strasser EF, Weiss D, et al. First comparative evaluation of a new leukapheresis technology in non-cytokine-stimulated donors. *Vox Sang* 2014;106:248-55.
- Strasser EF, Dittrich S, Weisbach V, et al. Comparison of two mononuclear cell program settings on two apheresis devices intended to collect high yields of CD14+ and CD3+ cells. *Transfusion* 2004;44:1104-11.
- Schooneman F. Extracorporeal photopheresis technical aspects. *Transfus Apher Sci* 2003;28:51-61.
- Perseghin P, Incontri A. Mononuclear cell collection in patients treated with extracorporeal photochemotherapy by using the off-line method: a comparison between COBE Spectra AutoPbsc version 6.1 and Amicus cell separators. *J Clin Apher* 2010;25:310-4.
- Schulz M, Bialleck H, Thoraus K, et al. Unstimulated leukapheresis in patients and donors: comparison of two apheresis systems. *Transfusion* 2014;54:1622-9.
- Taverna F, Coluccia P, Arienti F, et al. Biological quality control for extracorporeal photochemotherapy: assessing mononuclear cell apoptosis levels in ECP bags of chronic GvHD patients. *J Clin Apher* 2015;30:162-70.
- Perotti C, Del Fante C, Tinelli C, et al. Extracorporeal photochemotherapy in graft-versus-host disease: a longitudinal study on factors influencing the response and survival in pediatric patients. *Transfusion* 2010;50: 1359-69.
- Andreu G, Leon A, Heshmati F, et al. Extracorporeal photochemotherapy: evaluation of two techniques and use in connective tissue disorders. *Transfus Sci* 1994;15:443-54.
- Del Fante C, Scudeller L, Viarengo G, et al. Mononuclear cell collection for extracorporeal photochemotherapy: a study comparing an automatic and a semiautomatic apheresis device. *Transfusion* 2013;53:2027-33.
- Conradi R, Mitschulat H. Mononuclear cell collection with COM.TEC for extracorporeal photochemotherapy (ECP). *Vox Sang* 2010;99:413.
- Bohbot A, Liu V, Lioure B, et al. New technical developments. In: Greinix HT, Knobler R, editors. *Extracorporeal photopheresis: cellular photoimmunotherapy*. 1st ed. Berlin/Boston: Walter de Gruyter; 2012. p. 215.
- Liu C, Shah K, Dynis M, et al. Linear relationship between lymphocyte counts in peripheral blood and buffy coat collected during extracorporeal photopheresis. *Transfusion* 2013;53:2635-43.
- Kapadia E, Currier D, Perez-Albuena E, et al. Extracorporeal photopheresis performed on the CELLEX® compared with the UVAR-XTS® instrument is more efficient and better tolerated in children with steroid-refractory graft-versus-host disease. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62:1485-8.
- Hackstein H, Misterek J, Nockher A, et al. Mini buffy coat photopheresis for children and critically ill patients with extracorporeal photopheresis contraindications. *Transfusion* 2009;49:2366-73.
- Schmid D, Grabmer C, Streif D, et al. T-cell death, phosphatidylserine exposure and reduced proliferation rate to validate extracorporeal photochemotherapy. *Vox Sang* 2015;108:82-8.
- Perseghin P, Galimberti S, Balduzzi A, et al. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of chronic graft-versus-host disease: trend for a possible cell dose-related effect? *Ther Apher Dial* 2007;11:85-93.

24. Edelson RL. Mechanistic insights into extracorporeal photochemotherapy: efficient induction of monocyte-to-dendritic cell maturation. *Transfus Apher Sci* 2014;50: 322-9.
25. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007; 81:584-92.
26. Jacob MC, Manches O, Drillat P, et al. Quality control for the validation of extracorporeal photopheresis process using the Vilbert-Lourmat UV-A irradiation's system. *Transfus Apher Sci* 2003;28:63-70. 

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's Web site:

Fig. S1. (a) Collection efficiency of mononuclear cells (MNC) in offline ECP relative to the MNC concentration in peripheral blood before ECP; (b) MNC concentration relative to the hematocrit in the photopheresis bag (b). Sampling from offline ECP was done after 2.2-fold dilution in autologous plasma.

4 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden erstmals alle verwendeten Apheresesysteme für die ECP verglichen. Für eine erfolgreiche ECP sind Leukozyten und im Wesentlichen mononukleäre Zellen (MNC) erforderlich, die zur Therapie gesammelt werden müssen. Hier zeigten sich Unterschiede zwischen allen Offline-Methoden, die mit $57\text{--}66 \times 10^8$ MNC mehr als bei der Inline-Methode mit 14×10^8 MNC sammeln konnten. Zudem wurden die höheren Erträge in kürzerer Zeit erzielt (120 min, 275 min).

Diese Ergebnisse drücken die technische Überlegenheit der Offline-Apheresesysteme für die Zellsammlung aus. Leider ist nicht bekannt, welche weiteren Faktoren für eine erfolgreiche ECP-Therapie kritisch sind, z.B. Einhaltung von Mindestzeiten und Oberflächenbeschaffenheit der Schlauch- und Beutelmateriale für zelluläre Aktivierungsprozesse, eventuelle Temperaturabhängigkeiten und Weiteres.

Ungeachtet dessen sprechen diese Ergebnisse für eine bessere Eignung der Offline-Geräte, da bei der ECP keine Überdosierungen und Übertherapien bekannt sind. Vielmehr stellt ein eventuell verzögertes Ansprechen und die Notwendigkeit häufiger Therapiedurchführungen ein Problem dar.

Eine Einschränkung der vorliegenden Arbeit liegt zudem darin, dass die Apheresen nicht experimentell bei Probanden durchgeführt wurden. Die Rekrutierung und Behandlung von Versuchspersonen wurde hier nicht als ethisch vertretbar angesehen, da es sich um ansonsten etablierte Therapiemethoden handelt und der invasive Charakter der ECP gegen eine Durchführung ohne Notwendigkeit spricht.

Die Daten für die vorliegende Arbeit wurden mit Patienten erarbeitet, welche eine typische Zusammensetzung eines ECP-Patientenkollektivs aufweisen (Brosig et al. 2016). Insbesondere bildet die resultierende biologische Variation die Realitätsanforderungen an die ECP gut ab.

Es ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse verallgemeinerbar sind, da die Verfahren in Standardeinstellungen betrieben wurden und die Ergebnisse auch standardisiert als zelluläre Sammeleffizienz (CE) und Durchsatz (TP) ausgewertet wurden.

4.1 Leistungsfähigkeit der Apheresesysteme

Die unterschiedliche Leistungsfähigkeit der Apheresesysteme ist für die ECP und für jede andere Leukapherese relevant, die mit physiologischen Leukozytenwerten durchgeführt wird, z.B. für die Gewinnung therapeutischer T-Zellen und andere präparative Leukapheresen.

Apheresen, die mit den Geräten Amicus, Cobe Spectra und Spectra Optia durchgeführt wurden, hatten einen 4,0–4,7-fach höheren Gehalt an MNC (Lymphozyten, Monozyten) gegenüber dem Offline-System. Die Apheresegeräte unterschieden sich nicht wesentlich hinsichtlich der mononukleären Zellzusammensetzung mit Ausnahme der UVAR XTS, bei der ein hoher Anteil nicht-klassischer Monozyten auffällig war, eventuell aus patientenbedingten Faktoren. Patienten-Faktoren sind möglich, da die Patienten nicht auf die Geräte randomisiert wurden, sondern die Entscheidung aufgrund der medizinischen Anforderung getroffen wurde.

Die unterschiedliche granulozytäre Kontamination der Offline- und Inline-ECP (1,2–3,2% vs. 47,1%) kann als repräsentativ angesehen werden und ist aufgrund der technisch unterschiedlichen Konstruktionsprinzipien der Apheresegeräte mit dem ältesten (Latham-Bowl) in der Uvar XTS plausibel. Granulozytäre Kontaminationen in Blutprodukten können Nebenwirkungen verursachen (febrile Transfusionsreaktion u.a.) und werden seit 2001 in der EU durch technische Maßnahmen weitgehend entfernt. Ohne dass in dieser Studie spezifisch Nebenwirkungen erfasst wurden, ist davon auszugehen, dass granulozytenarme Apheresate der Verträglichkeit zuträglich sind.

Zu diskutieren sind ferner Unterschiede in der erythrozytären Kontamination, welche bei dem zweistufigen Separationsprinzip des Zellseparators Amicus mit 3,7% am höchsten lag. Erythrozyten sind für UV-Licht undurchlässig und beeinflussen die Inaktivierung von Lymphozyten negativ. Wenn eine gleiche Bestrahlungsdosis in den

Zellen erreicht werden soll, muss bei höherem Hämatokrit länger bestrahlt werden. Die Inline-ECP berücksichtigt dies, die offline-ECP-Geräte für die UV-Bestrahlung nur teilweise, was hier nicht jedoch untersucht wurde.

Erythrozyten, die im ECP-Leukapheresat UV-Licht absorbieren, können im Falle einer durch hohe Hämatokrit-Werte verlängerte Bestrahlungsdauer mit UV-Licht auch zu einer Temperaturerhöhung beitragen. Höhere Inkubationstemperaturen können z.B. durch die Induktion von Hitzeschockproteinen und anderer temperaturabhängiger Prozesse einen möglicherweise positiven Einfluss haben.

Thrombozyten schließlich sind als eine erwünschte Kontamination anzusehen und wurden in allen Apheresetechniken nachgewiesen, wenngleich in unterschiedlicher Konzentration. Von Thrombozyten ist keine minimale Schwellendosis bekannt, so dass nicht von einer Relevanz auszugehen ist.

4.2 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Apherese-Gerätetechnik auf die zelluläre Zusammensetzung der ECP-Apheresen untersucht. Die Bedeutung der Unterschiede bleibt bei aller Relevanz zumindest partiell unklar, da der Wirkmechanismus der ECP partiell unklar ist.

So ist die Bedeutung von zellulären Subkompartimenten nicht klar. Denkbar ist beispielsweise, dass spezielle Monozyten, T- oder B-Zellen eine besondere Bedeutung für die ECP-Wirksamkeit haben, die derzeit nicht hinreichend charakterisiert werden können. Die allgemeine Leukapherese, welche für die ECP-Durchführung derzeit verwendet wird, kann hier als wenig spezifisch angesehen werden. Spezifischere Apheresen sind allerdings technisch nicht verfügbar.

Zukünftige Arbeiten könnten sich mit zellulären Oberflächenprozessen beschäftigen, da die immunologische Aktivierung im Schichtsystem an einigen der beteiligten Oberflächen abläuft. Ob dies durch den abzusehenden Wechsel von DEHP-haltigen zu weichmacherfreien Kunststoffen, wie z.B. DINCH, beeinflusst wird, ist derzeit noch nicht absehbar.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit „Technical comparison of four different extracorporeal photopheresis systems“ beschreibt den Vergleich von vier verschiedenen Apheresesystemen im Hinblick auf technische Aspekte im Rahmen der extracorporalen Photopheresetherapie und ermöglicht einen Einblick in die Leistungsfähigkeit der einzelnen Verfahren. Dabei wurden technische Verfahrensdaten analysiert, sowie die zelluläre Zusammensetzung von peripherem Blut und Leukapheresaten prospektiv untersucht. Diese Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf technische Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede der Apheresesysteme zu, wobei die drei Offline-Verfahren (Amicus, Optia und Cobe Spectra) Ähnlichkeiten hinsichtlich Zellkomposition der Leukapheresate und technischen Abläufen aufweisen und sich diesbezüglich vom betrachteten Inline-System (Therakos UVAR XTS) abgrenzen lassen. Besonders fällt dabei auf, dass die Apherese mononukleärer Zellen bei allen Offline-ECP-Verfahren effektiver als bei der Inline-ECP (Median, 57×10^8 - 66×10^8 vs. 14×10^8) ist, jedoch der Anteil nicht-klassischer Monozyten bei der Inline-ECP höher ausfällt (Median, 82%) als bei den Offline-Verfahren (Median 14-19%). Auch wenn die direkte klinische Relevanz der beschriebenen Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Apheresesysteme nicht an einem Parameter speziell auszumachen ist, so schafft dieser Vergleich dennoch eine Grundlage z.B. dafür, die Aspekte zellulärer Aktivierung und Interaktion genauer zu analysieren, um weitere Details der Wirkweise der ECP zu entschlüsseln.

Referenzen

- Berger, C. L., Cantor, C., Welsh, J., Dervan, P., Begley, T., Grant, S., et al. (1985). Comparison of synthetic psoralen derivatives and 8-MOP in the inhibition of lymphocyte proliferation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 453, 80–90.
- Brosig, A., Hähnel, V., Orsó, E., Wolff, D., Holler, E., & Ahrens, N. (2016). Technical comparison of four different extracorporeal photopheresis systems. *Transfusion*, 56(10), 2510–2519. doi:10.1111/trf.13728
- Durazzo, T. S., Tigelaar, R. E., Filler, R., Hayday, A., Girardi, M., & Edelson, R. L. (2014). Induction of monocyte-to-dendritic cell maturation by extracorporeal photochemotherapy: Initiation via direct platelet signaling. *Transfusion and Apheresis Science*, 50(3), 370–378. doi:10.1016/j.transci.2013.11.008
- Edelson, R., Berger, C., Gasparro, F., Jegasothy, B., Heald, P., Wintroub, B., et al. (1987). Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma by Extracorporeal Photochemotherapy. *New England Journal of Medicine*, 316(6), 297–303. doi:10.1056/NEJM198702053160603
- Edelson, R. L. (2014). Mechanistic insights into extracorporeal photochemotherapy: Efficient induction of monocyte-to-dendritic cell maturation. *Transfusion and Apheresis Science*, 50(3), 322–329. doi:10.1016/j.transci.2013.07.031
- El Mofty, A. M. (1948). A preliminary clinical report on the treatment of leucoderma with *Ammi majus* Linn. *The Journal of the Egyptian Medical Association*, 31(8), 651–65.
- Farahnik, B., Nakamura, M., Singh, R. K., Abrouk, M., Zhu, T. H., Lee, K. M., et al. (2016). The Patient's Guide to Psoriasis Treatment. Part 2: PUVA Phototherapy. *Dermatology and Therapy*, 6(3), 315–324. doi:10.1007/s13555-016-0130-9
- Gazith, J., Schalla, W., & Schaefer, H. (1978). 8-Methoxypsoralen-gas chromatographic determination and serum kinetics. *Archives of dermatological research*, 263(2), 215–222.
- Hannani, D. (2015). Extracorporeal Photopheresis: Tolerogenic or Immunogenic Cell Death? Beyond Current Dogma. *Frontiers in Immunology*, 6, 5–8. doi:10.3389/fimmu.2015.00349
- Pannenbecker, A. (2016). Arzneimittelrechtliche Rahmenbedingungen der extrakorporalen Photopherese TT - Drug Law Regulations for the Extracorporeal

- Photopheresis. *Transfusionsmedizin*, 6(4), 182–192. doi:10.1055/s-0042-117621
- Prince, H. M., Whittaker, S., & Hoppe, R. T. (2009). How I treat mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Blood*, 114(20), 4337–4353. doi:10.1182/blood-2009-07-202895
- Schwartz, J., Padmanabhan, A., Aqui, N., Balogun, R. A., Connelly-smith, L., Delaney, M., et al. (2016). Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice — Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Seventh Special Issue, 338(April), 149–338. doi:10.1002/jca
- Wollowitz, S. (2001). Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. *Semin Hematol*, 38(4 Suppl 11), 4–11. doi:ashem0384e0004 [pii]

Danksagung

Von Herzen gilt mein Dank meiner wunderbaren Frau Bernadette, meinen Kindern Johanna und Sebastian, meinen Eltern Martina und Hermann, meinen Geschwistern Anja und Johannes, meinen Großmüttern Linde und Marie und meinen Großvätern Adolf und Ferdinand. Auf so vielfältige Weise habt ihr alle mich unterstützt und mich immer wieder neue Freude und Kraft finden lassen.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Norbert Ahrens, der trotz langer Arbeitstage immer Zeit fand mich zu motivieren, Anregungen gab und Ideen mit mir diskutierte. Seine Unterstützung half mir sehr das Ziel nie aus den Augen zu verlieren.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt auch meiner Kollegin Frau Dr. Viola Hähnel für viele kommunikative und konstruktive Diskussionen, die mich stets aufs Neue anspornten.

Und nicht zuletzt möchte ich auch meinen Kolleginnen und Kollegen Frau Dr. Katharina Dullinger, Frau Irene Pamler, Herrn Dr. Robert Offner und Herrn Morad Mohrez für ihre Motivation und stetige Unterstützung meinen Dank aussprechen und auch das pflegerische Team der Transfusionsmedizin um Frau Christine Becke und Frau Renate Hahnl soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben: Vielen Dank für eure Mühe und Zeit.

Curriculum Vitae

Entfällt in den Pflichtexemplaren.