

А.С. Мануилов<sup>1</sup>, И.В. Кудрявцев<sup>2,3</sup>, М.К. Серебрякова<sup>2</sup>,  
А.С. Трулев<sup>2</sup>, С.Н. Бардаков<sup>1</sup>, А.В. Апчел<sup>1</sup>, А.Н. Бельских<sup>1</sup>,  
М.В. Захаров<sup>1</sup>, В.В. Тишко<sup>1</sup>, А.А. Соколов<sup>1</sup>, И.А. Васильева<sup>4</sup>

## Возможности биологического контроля экстракорпоральной фотохимиотерапии

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург

<sup>4</sup>Первый государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург

**Резюме.** Изложены результаты определения уровней апоптоза *in vitro* в лимфоцитах в ходе проведения процедур экстракорпоральной фотохимиотерапии (экстракорпорального фотофереза) при помощи проточной цитометрии. Установлено, что проведение экстракорпорального фотофереза не оказывает существенного влияния на жизнеспособность клеток непосредственно после проведения процедур. Так, относительное содержание живых клеток в образцах после выделения мононуклеарной фракции периферической крови не отличалось как от образцов, подготовленных для фотофереза, так и образцов после проведения этой процедуры. Проведение экстракорпорального фотофереза не приводит к быстрой гибели клеток. Вместе с тем уровень живых лимфоцитов в начале эксперимента в среднем составлял около 80 процентов, тогда как применяемый в ходе собственного исследования протокол выделения мононуклеарной фракции клеток периферической крови и дальнейшие манипуляции с ними в условиях *in vitro* позволили повысить процент живых клеток в образцах до 90% и более. Увеличение уровня клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза, возникает уже в первые сутки после начала эксперимента, что подтверждается данными других исследователей, указывающих на наличие достоверных различий по жизнеспособности клеток с начальной точкой в интервале 20–24 ч инкубации *in vitro*. Запуск процессов программированной клеточной гибели в случае собственных экспериментов был связан не с подготовкой образцов для экстракорпорального фотофереза (о чем свидетельствует обнаруженное нами отсутствие значимых различий между свежeweделенными лимфоцитами и образцами, подготовленными для проведения методики), а с самой процедурой фотофереза.

**Ключевые слова:** живые клетки, мононуклеары, ранний апоптоз, поздний апоптоз, экстракорпоральный фотоферез, иммуномодулирующая терапия, клеточный иммунитет, иммунная система, проточная цитометрия.

**Введение.** Терапия «будущего» представляет собой воздействие на клеточные механизмы внутренней среды организма и регуляцию системы гомеостаза [2]. Недостаточная эффективность применяемых лекарственных средств, выраженные побочные эффекты и их непереносимость способствуют поиску новых подходов лечения, основанных не только на введении в организм лекарств, но и их выведения, замещения и обработки крови больных [1].

Одним из современных и перспективных направлений экстракорпоральной гемокоррекции является экстракорпоральная фотохимиотерапия или экстракорпоральный фотоферез (ЭКФ) [13].

Впервые ЭКФ применил Эдельсон в 1987 г. для лечения Т-клеточной лимфомы кожи [8]. Предшественником фотофереза была PUVA-терапия (Psoralens and Ultra Violet A-терапия), активно применявшаяся в дерматологии в XX в. Но данная методика используется только при поражении кожных покровов и неэффективна при системной патологии [12]. На сегодняшний день ЭКФ представляет собой неагрессивную иммуномодулирующую терапию с низким спектром токсичности [5]. ЭКФ уменьшает реактивность иммунной

системы, способствуя развитию иммунологической толерантности к собственным клеткам и тканям [7]. В то же время это позволяет поддерживать иммунную целостность как гуморального, так и Т-клеточного ответа на внешние патогены [26].

ЭКФ применяется при синдромах и заболеваниях, в патогенетической основе которых основную роль играют Т-лимфоциты [19]. Кроме того, ЭКФ входит в состав комбинированной терапии некоторых аутоиммунных заболеваний с преимущественным вовлечением клеточного звена приобретенного иммунитета – вульгарная пузырчатка [21], системный склероз [14], ревматоидный артрит [15], болезнь Крона [4] и рассеянный склероз [6].

Более того, ЭКФ был рекомендован Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в Соединенных Штатах Америки (США) для купирования отторжения трансплантата сердца, почек, легких [3, 16, 17, 24, 25], лечения острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина» после аллогенной стволовой пересадки гемопоэтических клеток резистентной к обычной иммуносупрессивной терапии [11, 20].

ЭКФ является методикой терапевтического афереза, которая включает в себя сепарацию мононуклеарных клеток из сосудистого русла, экстракорпоральное облучение их ультрафиолетовыми лучами в присутствии фотосенсибилизирующего агента и реинфузию обработанных клеток обратно пациенту [18].

Одним из главных механизмов действия ЭКФ на мононуклеарные клетки периферической крови является активация внутриклеточных каспаз, отвечающих как за индукцию апоптоза, так и за синтез некоторых цитокинов [27]. Активация каспаз в цитоплазме клетки возможна по рецептор-зависимому или по митохондриальному сигнальным путям. Так, в случае рецептор-зависимого пути запуска апоптоза ключевая роль отводится активации иницирующей каспазы-8, в составе продомена которой имеются повторы DED для взаимодействия с белком FADD. При митохондриальном сигнальном пути индукции апоптоза ключевое место отводится каспазе-9, в составе которой находится домен CARD, отвечающий за связывание с аналогичным доменом белка APAF-1, что, в конечном итоге, приводит к формированию апоптосомы. Оба эти пути направлены на активацию каспазы-3 – ключевую эффекторную каспазу эукариотических клеток. До настоящего времени точно не исследовано, какой из путей активации каспаз имеет место при проведении ЭКФ, но увеличение уровня апоптоза в клетках после данной процедуры отмечается в немногочисленных работах по данной проблематике [10]. Хотя ЭКФ находится в клиническом применении более 25 лет и широко используется в терапии многих заболеваний и синдромов с нарушением иммунореактивности, механизм лечебного действия остается до конца не изученным.

Известно, что активированный 8-метоксопсорален (8-MOP) образует ковалентные связи с пиримидиновыми основаниями дезоксирибонуклеиновой кислоты, ингибируя пролиферацию мононуклеаров и вызывает апоптоз лимфоидных клеток, особенно естественных киллеров и Т-клеток [9].

В настоящее время нет общего соглашения по протоколу, принятому для биологического контроля ЭКФ. В качестве маркеров биологического контроля ЭКФ нами оценивалась кинетика апоптоза посредством определения раннего и позднего апоптоза в облученных лимфоцитах, мембранный потенциал митохондрий, а также проницаемость клеточной мембраны при помощи проточной цитометрии.

**Цель исследования.** Исследовать кинетику апоптоза *in vitro* в ходе проведения экстракорпорального фотофереза.

**Материалы и методы.** Апоптоз исследовали в мононуклеарных клетках после введения фотосенсибилизатора и облучения ультрафиолетовым светом. Выделение мононуклеарных клеток осуществляли с помощью клеточного сепаратора «Spectra Optia» фирмы «Terumo BTL» (США) по протоколу выделения мононуклеарных клеток с контролем общего клиниче-

ского анализа крови перед проведением процедуры ЭКФ на границе раздела клеточных масс. Через сепаратор центрифугировали 2–3 объема циркулирующей крови. В качестве антикоагулянта использовался 4% раствор цитрата натрия в количестве 500–1000 мл. Для профилактики цитратной интоксикации применяли 10% раствор глюконата кальция количестве 10–20 мл. За одну процедуру выделяли от 100 до 150 мл концентрата мононуклеарных клеток, к которым добавляли физиологический раствор, доводя общий объем до 300 мл.

В качестве фотосенсибилизирующего препарата использовали раствор 8-MOP в дозе 200 нг/кг.

После 15-минутной инкубации в темном помещении клеточную суспензию подвергали ультрафиолетовому воздействию на аппарате для фотофереза «Masogenic G2» фирмы «Masopharma» (Франция) при испускаемой длине волн 315–400 нанометров (нм) с максимумом на 350 нм и интенсивностью облучения 10 мВ/см<sup>2</sup>. Общее время облучения от 10 до 15 минут. Общая доза экспозиции составляла 2,0 Дж/см<sup>2</sup>. После облучения из клеточной суспензии забирали 5 мл мононуклеаров для изучения апоптоза, а остальные клетки реинфузировали пациенту в течение 30 мин в соответствии с протоколом проведения фотофереза.

При изучении апоптоза полученную суспензию клеток дважды отмывали полной культуральной средой (ПКС), приготовленной на основе «RPMI-1640» фирмы «Биолот» (Санкт-Петербург) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 50 мкг/мл гентамицина и 2 мМ L-глутамина в течение 7 мин при 300 г. Концентрацию клеток определяли при помощи гемоцитометра. Для постановки экспериментов в лунки 24-луночных планшетов фирмы «Sarstedt» (Германия) вносили по 1000 мкл клеточной суспензии ( $2,5 \times 10^6$  клеток в мл) в ПКС и инкубировали 24, 48 и 72 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. По завершении инкубации клетки ресуспендировали в охлажденном забуференном фосфатами физиологическом растворе (ЗФР), содержащем 2% ЭТС, переносили в пробирки для проведения проточной цитометрии на аппарате фирмы «Beckman Coulter Inc.» (США) и дважды отмывали избытком ЗФР (300 г в течение 8 мин). Полученную суспензию клеток использовали для постановки экспериментов.

Для оценки мембранного потенциала митохондрий к 100 мкл клеточной суспензии ( $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) добавляли 20-кратный рабочий раствор DiOC<sub>6</sub>(3) фирмы «Invitrogen» (США), получая конечную концентрацию красителя равную 20 нМ. После внесения красителя образцы тщательно перемешивали и инкубировали в течение 20 мин при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в защищенном от света месте. По завершении инкубации образцы отмывали избытком ЗФР, содержащим 2% ЭТС (7 мин при 330 г). После чего надосады удаляли, а клеточный осадок переводили в 100 мкл свежего ЗФР. В полученную клеточную суспензию вносили 10 мкл раствора йодистого про-

пидия (PI) фирмы «Sigma-Aldrich» (США), получая финальную концентрацию PI, равную 1 мкг/мл. После этого образцы инкубировали еще в течение 10 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. По завершении инкубации в образцы вносили по 200 мкл ЗФР и проводили цитометрический учет. Для каждого из образцов анализировали не менее 50000 одиночных клеток. Чтобы отличить одиночные клетки от слипшихся и в последующем дискриминировать агрегаты из анализа, использовали следующие сочетания сигналов по прямому (величина, пропорциональная размеру клеток) и боковому (величина, характеризующая структуру клеток) светорассеянию.

Обработку результатов проточной цитометрии (рис. 1) проводили с использованием программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.5a фирмы «Beckman Coulter Inc.» (США). Живые клетки обладали яркой флуоресценцией по каналу, предназначенному для детекции DiOC<sub>6</sub>(3), но не накапливали PI (фенотип DiOC<sub>6</sub>(3)<sup>bright</sup>PI<sup>-</sup>). Клетки, находившиеся на ранних стадиях апоптоза (митохондриальный потенциал снижен, но плазматическая мембрана еще сохраняет свою целостность – не проницаема для PI) определялись как DiOC<sub>6</sub>(3)<sup>dim-to-neg</sup>PI<sup>-</sup>. Тогда как лимфоциты, находившиеся на поздних стадиях апоптоза или уже погибшие (некрот), не эффективно накапливали DiOC<sub>6</sub>(3), но ярко окрашивались PI – фенотип DiOC<sub>6</sub>(3)<sup>dim-to-neg</sup>PI<sup>+</sup> (рис. 1).

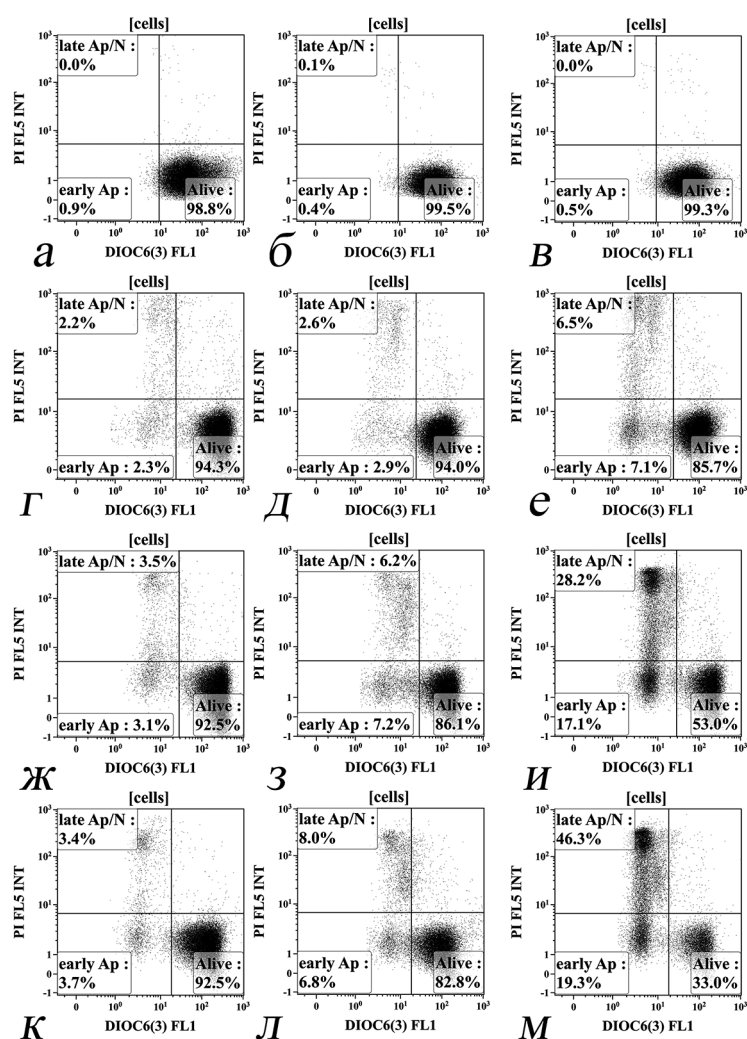


Рис. 1. Определение уровня апоптоза в лимфоцитах в ходе проведения ЭФК при помощи проточной цитометрии.

По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции липофильного катионного красителя DiOC<sub>6</sub>(3); по оси ординат – интенсивность флуоресценции ДНК-связывающего красителя PI. «Alive» – живые клетки с фенотипом DiOC<sub>6</sub>(3)<sup>bright</sup>PI<sup>-</sup>, «early Ap» – клетки на ранних стадиях апоптоза (DiOC<sub>6</sub>(3)<sup>dim-to-neg</sup>PI<sup>-</sup>), «late Ap/N» – поздний апоптоз/некрот (фенотип DiOC<sub>6</sub>(3)<sup>dim-to-neg</sup>PI<sup>+</sup>). Относительное содержание клеток приведено в виде % от общего числа проанализированных клеток в образце. Гистограммы а, г, ж, к – свежeweделенные мононуклеарные клетки периферической крови на сроках 0, 24, 48 и 72 ч инкубации in vitro; гистограммы б, д, з, л – мононуклеарные клетки периферической крови, подготовленные для проведения ЭФК, на сроках 0, 24, 48 и 72 ч инкубации in vitro; гистограммы в, е, и, м – мононуклеарные клетки периферической крови, в ходе проведения ЭФК, на сроках 0, 24, 48 и 72 ч инкубации in vitro

Статистический анализ полученных данных осуществляли при помощи пакетов программ Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Результат выражали в % от общего числа одиночных клеток и приводили в виде среднего и ошибки среднего. Для сравнения парных количественных значений использовали t-критерий Стьюдента. Длительность исследования составила 12 месяцев. Было обработано 100 проб мононуклеарных клеток.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что проведение ЭКФ не оказывает существенного влияния на жизнеспособность клеток непосредственно после проведения облучения (рис. 2). Так, относительное содержание живых клеток в образцах после выделения мононуклеарной фракции периферической крови составляло  $93,57 \pm 0,89\%$ , что достоверно не отличалось как от образцов, подготовленных для ЭКФ, так и образцов после проведения ЭКФ ( $93,36 \pm 1,69$  и  $91,74 \pm 2,41\%$  соответственно). Содержание клеток с фенотипом  $DiOC_6(3)^{dim-to-negPI^-}$ , свойственным лимфоцитам находящимся на ранних стадиях апоптоза, также достоверно не различалось между исследованными образцами и находилось в пределах 5% от общего числа проанализированных лимфоцитов ( $5,19 \pm 0,69$ ,  $4,31 \pm 0,89$  и  $5,24 \pm 1,05\%$  соответственно). Что же касается клеток, утративших целостность поверхностной мембраны (фенотип  $DiOC_6(3)^{dim-to-negPI^+}$ ), то их относительное содержание не превышало 1–3% и составляло  $1,22 \pm 0,52$ ,  $2,33 \pm 1,33$  и  $3,00 \pm 1,99\%$  соответственно, от общего количества числа лимфоцитов, содержащихся в образцах после выделения мононуклеарной фракции клеток периферической крови до и после проведения ЭКФ (рис. 2).

В ходе дальнейших исследований была проведена оценка уровня апоптоза в полученных образцах мононуклеарных клеток периферической крови через 24, 48 и 72 ч культивирования в условиях *in vitro*. В случае свежевыделенных мононуклеаров относительное содержание живых клеток постепенно снижалось с  $93,57 \pm 0,89\%$  (в точке 0 часов) до  $90,70 \pm 0,93$  ( $p=0,037$ ),

$85,64 \pm 0,8$  ( $p<0,001$ ) и  $82,08 \pm 1,94\%$  ( $p<0,001$ ) через 24, 48 и 72 ч после начала эксперимента соответственно. При этом достоверных различий по относительному содержанию лимфоцитов, находящихся на ранних стадиях апоптоза, отмечено не было. Если в точке 0 часов содержание клеток с фенотипом  $DiOC_6(3)^{dim-to-negPI^-}$  составляло  $5,19 \pm 0,69\%$ , то через 24, 48 и 72 ч эта величина составляла  $5,34 \pm 0,92\%$  при  $p=0,899$ ,  $6,72 \pm 0,61\%$  при  $p=0,132$  и  $7,42 \pm 0,93\%$  при  $p=0,062$  соответственно. Вместе с тем, снижение относительного содержания живых клеток в образцах сопровождалось увеличением уровня погибших клеток – лимфоцитов с фенотипом  $DiOC_6(3)^{dim-to-negPI^+}$ , который соответствует клеткам, находящимся на терминальных стадиях апоптоза или некроза. Так, по мере культивирования *in vitro* процентное содержание этих лимфоцитов достоверно ( $p<0,001$ ) увеличивалось (во всех случаях при сравнении с точкой 0 часов) с  $1,22 \pm 0,52$  до  $3,96 \pm 0,3$ ,  $7,64 \pm 0,62$  и  $10,49 \pm 1,53\%$  соответственно.

Сходные тенденции были отмечены при исследовании динамики клеточной гибели *in vitro* в образцах, подготовленных для проведения ЭКФ. Так, отмечалось постепенное снижение уровня живых клеток с  $93,36 \pm 1,69$  до  $90,74 \pm 1,08$  ( $p=0,255$ ),  $80,63 \pm 2,32$  ( $p<0,001$ ) и  $72,11 \pm 4,8\%$  ( $p<0,001$ ) через 24, 48 и 72 ч после начала эксперимента соответственно. Вместе с тем, дополнительные манипуляции с образцами клеток при проведении пробоподготовки для ЭКФ сопровождалась индукцией апоптоза, что выражалось в достоверном увеличении уровня клеток с фенотипом  $DiOC_6(3)^{dim-to-negPI^-}$  с  $4,31 \pm 0,89\%$  в точке 0 ч до  $5,71 \pm 0,93$  ( $p=0,297$ ),  $9,5 \pm 1,27$  ( $p=0,001$ ) и  $11,08 \pm 1,33\%$  ( $p<0,001$ ) в точках 24, 48 и 72 ч после начала эксперимента соответственно. Достоверный прирост погибших клеток отмечался только спустя 48 ч ( $9,86 \pm 1,66\%$  при  $p=0,001$ ) и 72 ( $18,91 \pm 4,14\%$  при  $p<0,001$ ) часа после начала эксперимента, тогда как 24-часовая инкубация на данный показатель не влияла ( $3,54 \pm 0,35\%$  против  $2,33 \pm 1,33\%$  в начале эксперимента,  $p=0,471$ ). Проведение ЭКФ оказывало существенно влияние на снижение жизнеспособно-

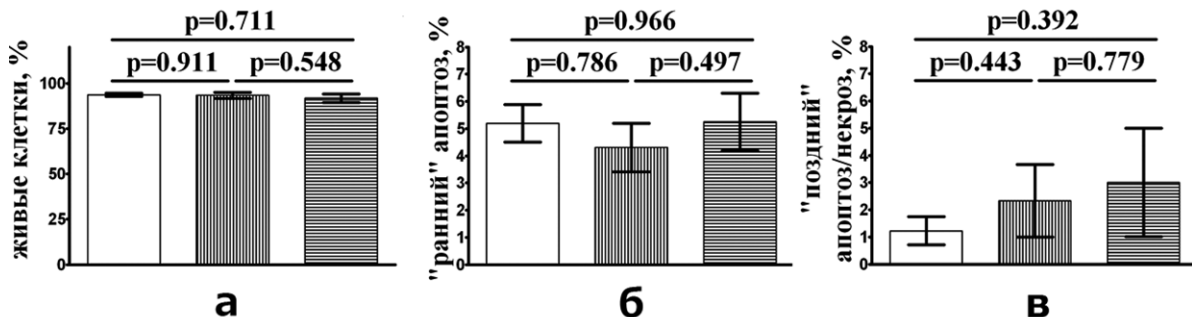


Рис. 2. Относительное содержание живых лимфоцитов (а), лимфоцитов на ранних (б) и поздних (в) стадиях апоптоза перед началом культивирования в условиях *in vitro*. Белый цвет – свежевыделенные мононуклеарные клетки периферической крови; вертикальная штриховка – мононуклеарные клетки периферической крови, подготовленные для проведения ЭКФ; горизонтальная штриховка – мононуклеарные клетки периферической крови в ходе проведения ЭКФ. Результаты приведены в виде среднего и ошибки среднего; указана достоверность различий согласно t-критерию Стьюдента

сти мононуклеарных клеток периферической крови уже на ранних сроках наблюдения. Так, уже через 24 ч после начала эксперимента уровень лимфоцитов с фенотипом  $DiOC_6(3)^{bright}PI^-$  достоверно ( $p=0,017$ ) снижался с  $91,74\pm 2,41$  до  $83,35\pm 2,05\%$ . Дальнейшее культивирование в условиях *in vitro* сопровождалось понижением данного показателя до  $60,78\pm 3,64\%$  ( $p<0,001$ ) и  $40,72\pm 4,45\%$  ( $p<0,001$ ) на вторые и третьи сутки инкубации. Более того, принципиальным отличием образцов, подвергнутых ЭКФ, от образцов сравнения было достоверное увеличение доли клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза, уже в первые сутки после начала эксперимента, когда данный показатель достоверно ( $p=0,023$ ) превысил значения точки 0 ч ( $9,67\pm 1,68\%$  против  $5,24\pm 1,05\%$ ). Через 48 и 72 ч также отмечалось увеличение процентного содержания лимфоцитов данной популяции ( $17\pm 1,59\%$  при  $p<0,001$  и  $18,43\pm 2,11\%$  при  $p<0,001$  соответственно). Процентное содержание погибших клеток – фенотип  $DiOC_6(3)^{dim-to-neg}PI^-$  – между точками 0 и 24 ч достоверно не различалось ( $3\pm 1,99$  и  $6,99\pm 1,08\%$  соответственно). Дальнейшее культивирование *in vitro* сопровождалось резкими приростами доли погибших клеток до  $22,22\pm 2,81\%$  ( $p<0,001$ ) и  $40,83\pm 4,01\%$  ( $p<0,001$ ) через 48 и 72 ч соответственно.

Для оценки влияния ЭКФ на жизнеспособность лимфоцитов *in vitro* было проведено парное сравнение образцов, полученных от каждого пациента, с использованием критерия Вилкоксона для парных значений, результаты которого для популяции живых клеток приведены на рисунке 3.

Показано, что достоверные различия между свежeweделенными мононуклеарами периферической крови и образцами, подготовленными для ЭКФ, наблюдаются лишь на третьи сутки после начала эксперимента (рис. 3 а, г, ж). Вместе с тем, проведение ЭКФ приводит к снижению жизнеспособности лимфоцитов уже в первые сутки культивирования в условиях *in vitro* как при сравнении с интактными свежeweделенными клетками (рис. 3 б, д, з), так и лимфоцитами, подготовленными для ЭКФ (рис. 3 в, е, и). Увеличение уровня лимфоцитов, находящихся на ранних стадиях апоптоза, отмечается на вторые сутки инкубации *in vitro* при сравнении свежeweделенных мононуклеаров периферической крови с образцами, подготовленными для ЭКФ (рис. 4 а, г, ж). С другой стороны, проведение ЭКФ сопровождалось приростами клеток с фенотипом  $DiOC_6(3)^{dim-to-neg}PI^-$  при сравнении этих образцов с другими.

Показано, что подготовка клеток для проведения ЭКФ не оказывает существенного влияния на жизнеспособность лимфоцитов, на что указывает отсутствие достоверных различий по клеткам с фенотипом  $DiOC_6(3)^{dim-to-neg}PI^+$  между свежeweделенными мононуклеарами и лимфоцитами после проведения всех стадий подготовки для ЭКФ (рис. 5 а, г, ж). Вместе с тем, прирост погибших клеток в образцах отмечается уже через 24 ч после ЭКФ, а при дальнейшей инкубации – 48 и 72 ч – обнаруженные тенденции сохраняются.

В целом проведение ЭКФ не приводит к быстрой гибели клеток, о чем свидетельствуют результаты, приведенные на рисунке 2. Сходные результаты

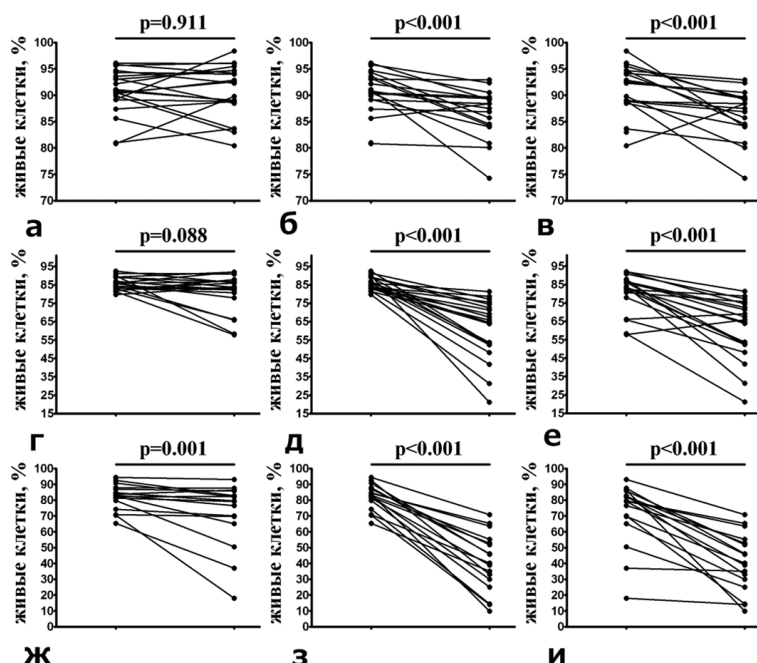


Рис. 3. Относительное содержание живых лимфоцитов в ходе проведения ЭКФ на различных сроках культивирования в условиях *in vitro*. Слева направо – результаты попарного сравнения образцов после сепарации лимфоцитов и подготовки к ЭКФ; образцов после сепарации лимфоцитов и проведения ЭКФ, а также образцов после подготовки к ЭКФ и проведения ЭКФ. Сверху вниз – результаты, полученные после 24, 48 и 72 ч инкубации в условиях *in vitro*. Для каждой из пар образцов указаны различия согласно критерию Вилкоксона для парных значений

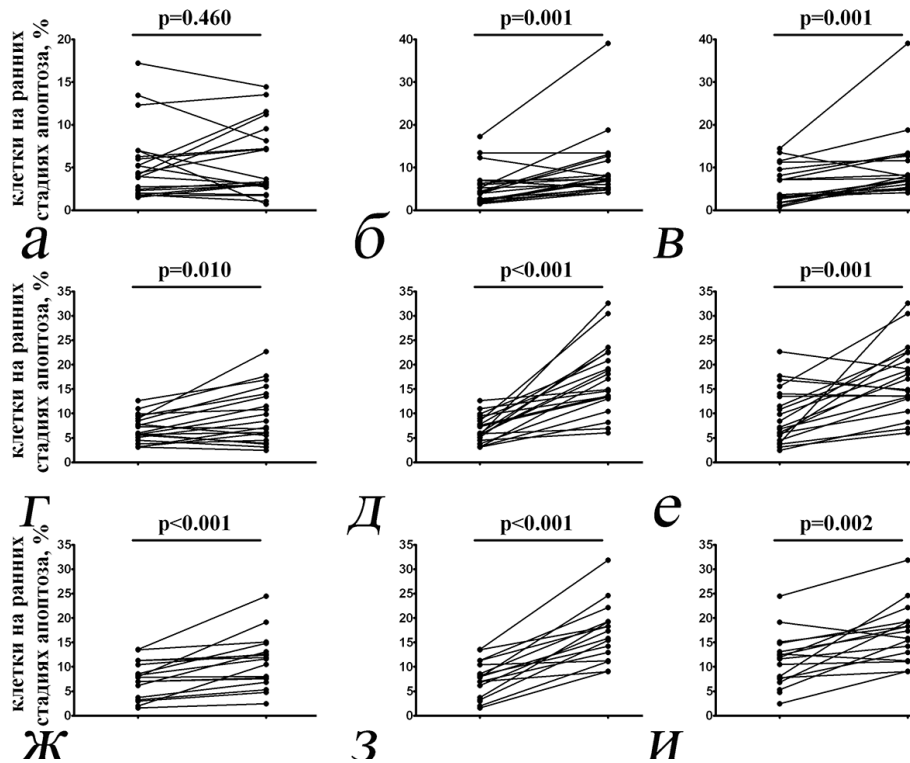


Рис. 4. Относительное содержание лимфоцитов, находящихся на ранних стадиях апоптоза, в ходе проведения ЭФК на различных сроках культивирования в условиях *in vitro*. Гистограммы а, г и ж – результаты попарного сравнения образцов, содержащих свежевыведенные мононуклеарные клетки периферической крови (слева), или мононуклеарные клетки периферической крови, подготовленные для проведения ЭФК (справа) на сроках 24, 48 и 72 ч; гистограммы б, д и з – результаты попарного сравнения образцов, содержащих свежевыведенные мононуклеарные клетки периферической крови (слева), или мононуклеарные клетки периферической крови в ходе проведения ЭФК (справа) на сроках 24, 48 и 72 ч; гистограммы в, е, и – результаты попарного сравнения образцов, мононуклеарные клетки периферической крови, подготовленные для проведения ЭФК (слева), или мононуклеарные клетки периферической крови в ходе проведения ЭФК (справа) на сроках 24, 48 и 72 ч. Для каждой из пар образцов указаны различия согласно критерию Вилкоксона для парных значений

были получены F. Taverna et al. [23], показавшими, что через 4 ч после ЭКФ достоверных различий по относительному содержанию живых лимфоцитов, а также клеток, находящихся на ранних и поздних стадиях апоптоза, по сравнению с точной 0 ч, отмечено не было. Вместе с тем, в рамках только что упомянутого исследования уровень живых лимфоцитов в начале эксперимента в среднем составлял около 80%, тогда как применяемый в ходе собственного исследования протокол выделения мононуклеарной фракции клеток периферической крови и дальнейшие манипуляции с ними в условиях *in vitro* позволили повысить процент живых клеток в образцах до 90% и более. Увеличение уровня клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза, отмечено нами уже на первые сутки после начала эксперимента (см. рис. 3), что подтверждается данными других исследователей, указывающих на наличие достоверных различий по жизнеспособности клеток с начальной точкой в интервале 20–24 ч инкубации *in vitro* [22]. Запуск процессов программированной клеточной гибели в случае собственных экспериментов был связан не с подготовкой образцов для ЭКФ (о чем свидетель-

ствует обнаруженное нами отсутствие значимых различий между свежевыведенными лимфоцитами и образцами, подготовленными для проведения ЭКФ, см. рис. 3, 4 и 5), а с самой процедурой ЭКФ. К сожалению, в большинстве опубликованных работ по данной тематике такие контрольные образцы отсутствуют, что не позволяет оценить качество пробоподготовки при проведении ЭКФ.

**Заключение.** Проточная цитометрия позволяет обоснованно раскрыть основной механизм действия экстракорпорального фотофереза на клеточном уровне, а именно индукцию апоптоза в лимфоцитах периферической крови. Полученные данные принципиально отличаются от образцов, подвергнутых экстракорпоральному фотоферезу, а также от образцов сравнения. Достоверное увеличение доли клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза, возникает уже в первые сутки после начала эксперимента. Через 48 и 72 ч также отмечается увеличение относительного содержания погибающих лимфоцитов с максимальными показателями раннего и позднего апоптоза.

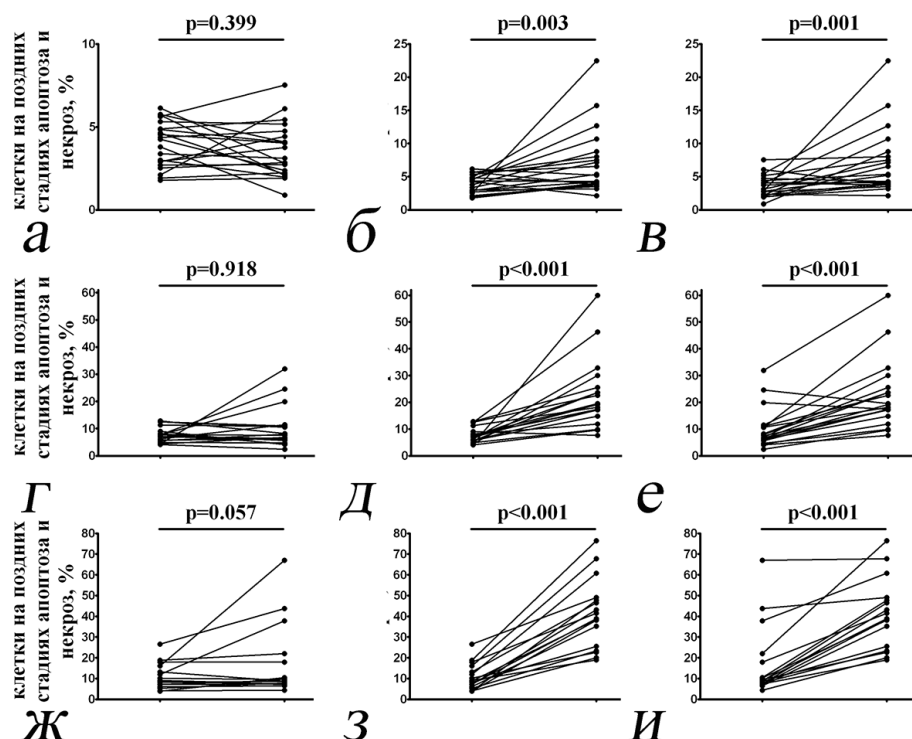


Рис. 5. Относительное содержание лимфоцитов, находящихся на поздних стадиях апоптоза, в ходе проведения ЭФК на различных сроках культивирования в условиях *in vitro*. Гистограммы а, г и ж – результаты по парного сравнения образцов, содержащих свежесыведенные мононуклеарные клетки периферической крови (слева) или мононуклеарные клетки периферической крови, подготовленные для проведения ЭФК (справа) на сроках 24, 48 и 72 ч; гистограммы б, д и з – результаты по парного сравнения образцов, содержащих свежесыведенные мононуклеарные клетки периферической крови (слева) или мононуклеарные клетки периферической крови в ходе проведения ЭФК (справа) на сроках 24, 48 и 72 ч; гистограммы в, е, и – результаты по парного сравнения образцов, мононуклеарные клетки периферической крови, подготовленные для проведения ЭФК (слева) или мононуклеарные клетки периферической крови в ходе проведения ЭФК (справа) на сроках 24, 48 и 72 ч. Для каждой из пар образцов указаны различия согласно критерию Вилкоксона для парных значений

### Литература

- Соколов, А.А. Эфферентные методы интенсивной терапии аутоиммунных и метаболических заболеваний (экспериментально-клиническое исследование): дис. ... д-ра мед. наук / А.А. Соколов. – СПб.: МАПО, 2007. – 505 с.
- Черешнев, В.А. Фармакологическое регулирование программированной гибели клеток / В.А. Черешнев, В. Н. Цыган, М.М. Одинак. – СПб.: Наука, 2011. – 255 с.
- Barr, M. Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. Photopheresis Transplantation Study Group / M. Barr [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1998. – Vol. 339. – P. 1744–1751.
- Bisaccia, E. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of refractory Crohn's disease / E. Bisaccia [et al.] // Transfus. Apher. 2007. – Vol. 37 – P. 171–174
- Capuano, M. Current clinical applications of extracorporeal photochemotherapy / M. Capuano [et al.] // Therapeutic Apheresis and Dialysis – 2015. – Vol. 19, № 2. – P. 103–110.
- Cavaletti, G. Extracorporeal photochemotherapy: a safety and tolerability pilot study with preliminary efficacy results in refractory relapsing-remitting multiple sclerosis / G. Cavaletti [et al.] // Neurol. 2006. – Vol. 27. – P. 24–32.
- Daniele, N. Evaluation of cell death after treatment with extracorporeal photopheresis / N. Daniele [et al.] // Transfus. Apher. – 2012. – Vol. 46. – P. 53–57.
- Edelson, R. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results / R. Edelson // N. Engl. J. Med. – 1987. – Vol. 316. – P. 297–303.
- Goussetis, E. Update on the mechanism of action and on clinical efficacy of extracorporeal photopheresis in the treatment of acute and chronic graft versus host disease in children / E. Goussetis [et al.] // Transfus. Apher. 2012. – Vol. 46. – P. 203–209.
- Hannani, D. Extracorporeal Photopheresis: Tolerogenic or Immunogenic Cell Death? Beyond Current Dogma / D. Hannani // Front Immunol. 2015. – Vol. 7. – P. 346–349.
- Hart, J. Extracorporeal photopheresis in the treatment of graft-versus-host disease: evidence and opinion / J. Hart [et al.] // Ther. Adv. Hematol. – 2013. – Vol. 4. – P. 320–334.
- Heshmati, F. Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy / F. Heshmati // Transfus. Apher. 2003. – Vol. 29. – P. 61–70.
- Knobler, R. Extracorporeal photopheresis: past, present, and future / R. Knobler [et al.] // R. J. Am. Acad. Dermatol. – 2009. – Vol. 61, № 4. – P. 652–665.
- Knobler, R. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of photopheresis in systemic sclerosis / R. Knobler [et al.] // J. Am. Acad. Dermatol. – 2006. – Vol. 54. – P. 793–799.
- Macheiner, W. Sezary syndrome and seronegative polyarthritis: treatment with extracorporeal photochemotherapy / W. Macheiner [et al.] // J. Am. Acad. Dermatol. – 2003. – Vol. 48. – P. 220–226.

16. Marques, M. Photopheresis in solid organ transplant rejection / M. Marques [et al.] // J. Clin. Apher. – 2006. – Vol. 21. – P. 72–77.
17. Marques, M. Update on extracorporeal photopheresis in heart and lung transplantation / M. Marques [et al.] // J. Clin. Apher. – 2011. – Vol. 26. – P. 146–151.
18. Marshall, S. Technology insight: ECP for the treatment of GvHD—can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? / S. Marshall [et al.] // Nat. Clin. Pract. Oncol. – 2006. – Vol. 3. – P. 302–314.
19. McKenna, K. Evidence-based practice of photopheresis 1987–2001: a report of a workshop of the British Photodermatology Group and the U.K. Skin Lymphoma Group / K. McKenna [et al.] // British Journal of Dermatology. – 2006. – Vol. 154, № 1. – P. 7–20.
20. Pierelli, L. Extracorporeal photopheresis for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease in adults and children: best practice recommendations from an Italian Society of Hemapheresis and Cell Manipulation (SIdEM) and Italian Group for Bone Marrow Transplantation (GITMO) consensus process / L. Pierelli [et al.] // Transfusion – 2013. – Vol. 53. – P. 2340–2352.
21. Saraceno, R. Therapeutic options in an immunocompromised patient with pemphigus vulgaris: potential interest of plasmapheresis and extracorporeal photochemotherapy / R. Saraceno [et al.] // Eur. J. Dermatol. – 2008. – Vol. 18. – P. 354–356.
22. Schmid, D. T-cell death, phosphatidylserine exposure and reduced proliferation rate to validate extracorporeal photochemotherapy / D. Schmid [et al.] // Vox. Sang. – 2015. – Vol. 108, № 1. – P. 82–88.
23. Taverna, F. Biological quality control for extracorporeal photochemotherapy: Assessing mononuclear cell apoptosis levels in ECP bags of chronic GvHD patients / F. Taverna [et al.] // J. Clin. Apher. 2015. – Vol. 30, № 6. – P. 162–170.
24. Urbani, L. The use of extracorporeal photopheresis for allograft rejection in liver transplant recipients / L. Urbani [et al.] // Transplant. Proc. – 2004. – Vol. 36. – P. 3068–3070.
25. Urbani, L. A novel immunosuppressive strategy combined with preemptive antiviral therapy improves the eighteen-month mortality in HCV recipients transplanted with aged livers / L. Urbani [et al.] // Transplantation. – 2008. – Vol. 86. – P. 1666–1671.
26. Voss, C. Extending the horizon for cell-based immunotherapy by understanding the mechanisms of action of photopheresis / C. Voss [et al.] // Transfus. Med. Rev. – 2010. – Vol. 24, № 1. – P. 22–32.
27. Yakut, E. Extracorporeal photopheresis promotes IL-1 production / E. Yakut [et al.] // J. Immunol. 2015. – Vol. 194, № 6. – P. 2569–2577.

A.S. Manuilov, I.V. Kudryavtsev, M.K. Serebriakova, A.S. Trulev, S.N. Bardakov,  
A.V. Apchel, A.N. Belskih, M.V. Zakharov, V.V. Tishko, A.A. Sokolov, I.A. Vasylieva

### Possibilities of biological control of extracorporeal photochemotherapy

**Abstract.** *The results of the determination of levels of apoptosis in vitro in lymphocytes during the procedures of extracorporeal photochemotherapy (extracorporeal photopheresis) using flow cytometry are described. It was found that carrying out extracorporeal photopheresis does not have a significant effect on the viability of cells immediately after the procedures. Thus, the relative content of living cells in the samples after isolation of the mononuclear fraction of peripheral blood did not differ from both samples prepared for photopheresis and samples after this procedure. It should be noted that carrying out extracorporeal photopheresis does not lead to rapid cell death. At the same time, the level of living lymphocytes at the beginning of the experiment averaged about 90%, while the protocol used to extract the mononuclear fraction of peripheral blood cells and further manipulations with them in vitro allowed increasing the percentage of living cells in the samples to 90% or more. An increase in the level of cells in the early stages of apoptosis occurs already in the first day after the beginning of the experiment, which is confirmed by the data of other researchers indicating that there are significant differences in the viability of cells with an initial point in the interval of 20–24 h in vitro incubation. The launch of the processes of programmed cell death in the case of own experiments was not related to the preparation of samples for extracorporeal photopheresis (as evidenced by the absence of significant differences between freshly isolated lymphocytes and samples prepared for the procedure), but with the procedure of photopheresis itself.*

**Key words:** *living cells, mononuclear cells, early apoptosis, late apoptosis, extracorporeal photopheresis, immunomodulating therapy, cellular immunity, immune system, flow cytometry.*

Контактный телефон: 8-911-713-85-00; e-mail: vmeda-nio@mail.ru