© Коллектив авторов, 2020

Козлов И.Б.¹, Ватазин А.В.², Кильдюшевский А.В.², Зулькарнаев А.Б.²,
Федулкина В.А.², Фаенко А.П.², Яздовский В.В.¹, Гудима Г.О.¹, Кофиади И.А.¹

Анализ экспрессии генов иммунной системы, ответственных за активацию и ингибирование Т-клеточного иммунного ответа, у реципиентов почечного трансплантата после ЭКФ

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», 129110, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. В связи с растущей потребностью в трансплантации почки востребовано применение новых методов профилактики отторжения трансплантата, базирующихся на механизмах естественной регуляции иммунного ответа. Одной из перспективных технологий в этой области является экстракорпоральный фотоферез (ЭКФ), основанный на электромагнитном воздействии на клетки реципиента. Клиническая эффективность ЭКФ подтверждена многими исследованиями, однако механизм терапевтического эффекта изучен недостаточно. Характеристика иммунного ответа при проведении ЭКФ является важным этапом на пути к формированию практических рекомендаций по клиническому применению ЭКФ и модификации иммуносупрессивной терапии.

Целью настоящего исследования стал анализ изменения уровня экспрессии генов, ответственных за активацию и ингибирование Т-клеточного иммунного ответа у реципиентов почечного трансплантата после ЭКФ.

Материал и методы. Было проведено открытое когортное рандомизированное исследование с участием 20 пациентов, которым выполнена односторонняя трансплантация трупной почки от неродственного донора. Реципиенты сравниваемых групп получали стандартную иммуносупрессивную терапию и аналогичную терапию в комплексе с процедурами ЭКФ, в соответствии с протоколом исследования. Анализ уровня экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени. Сравнение обследованных групп проводили в точке 1 (1–4-й день) и в точке 2 (30-й день).

Результаты. Проведено исследование функции органа у реципиентов парного алло-трансплантата почки, получавших стандартную иммуносупрессивную терапию и терапию в комбинации с ЭКФ. Анализ клинических данных в раннем посттрансплантационном периоде не показал статистически значимых клинических отличий, однако при конкретном рассмотрении каждого парного случая выявлена тенденция к некоторому улучшению скорости приживления пересаженного органа в ранние сроки после трансплантации, лучшей выживаемости трансплантата и реципиента. Определен уровень экспрессии генов регуляторов иммунного ответа (*CD28*, *CTLA4*, *PDL1*, *FOXP3*) и генов цитокинов (*TNFA*, *IL1*, *IL2*, *IL10*, *IFNG*) в обследованных группах.

Заключение. По результатам сравнительного анализа можно говорить о понижении уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов *IL1*, *IL2* и *IFNG* к 30-м суткам после трансплантации. Сравнение между группами на 30-й день обнаруживает значительное повышение уровня экспрессии генов *PDL1* и *FOXP3* ($p = 0,0009$ и $0,0013$, соответственно). Повышенная экспрессия этих генов может быть связана с активацией регуляторных Т-клеток и развитием периферической иммунной толерантности у пациентов, прошедших процедуру ЭКФ.

Ключевые слова: экстракорпоральный фотоферез; иммунная толерантность; анализ уровня экспрессии; регуляция иммунного ответа; регуляторные Т-клетки

Для корреспонденции

Зулькарнаев Алексей Батыргараевич –
доктор медицинских наук, профессор
кафедры трансплантологии,
нефрологии и искусственных органов
факультета усовершенствования
врачей ГБУЗ МО «Московский
областной научно-исследовательский
клинический институт
им. М.Ф. Владимирского»,
Москва,
Российская Федерация
E-mail: 7059899@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-5405-7887>

Статья поступила 06.11.2019. Принята в печать 16.12.2019.

Для цитирования: Козлов И.Б., Ватазин А.В., Кильдюшевский А.В., Зулкарнаев А.Б., Федулкина В.А., Фаенко А.П., Яздовский В.В., Гудима Г.О., Кофиади И.А. Анализ экспрессии генов иммунной системы, ответственных за активацию и ингибирование Т-клеточного иммунного ответа, у реципиентов почечного трансплантата после ЭКФ. Иммунология. 2020; 41 (1): 20–30. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-20-30

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых № МД-2253.2018.7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Kozlov I.B.¹, Vatazin A.V.², Kildushevsky A.V.², Zulkarnaev A.B.², Fedulkina V.A.², Faenko A.P.², Yazdovsky V.V.¹, Gudima G.O.¹, Kofiadi I.A.¹

Analysis of expression of immune system genes that are responsible for activation and inhibition of T-cell immune response in renal transplant recipients after extracorporeal photochemotherapy

¹ National Research Center Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

² State budgetary institution of health care of the Moscow region «Moscow regional research clinical Institute named after M.F. Vladimirsky», 129110, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Due to the uprising need for kidney transplantation, there is a demand for new methods of preventing rejection of the transplant, based on the mechanisms of natural regulation of the immune response. One of the promising technologies in this area is extracorporeal photopheresis (ECP), based on electromagnetic influence on the recipient's cells. The clinical efficacy of ECP has been confirmed by many studies, but the mechanism of therapeutic effect has not been sufficiently studied. Characterization of immune response during ECP is an important step towards formation of practical recommendations on clinical application of ECP and modification of immunosuppressive therapy.

The aim of this study was to analyze the changes in the expression level of the genes responsible for the activation and inhibition of the T-cell response in the recipients of the renal graft after ECP.

Material and methods. An open cohort randomized trial was conducted with 20 patients who underwent a single group cadaver kidney transplantation from an unrelated donor. The recipients of the compared groups received standard immunosuppressive therapy and the same therapy in combination with ECP procedures, according to the study protocol. The level of gene expression was analyzed by real-time RT-PCR. Comparison of the study groups was carried out in point 1 (1st–4th day) and point 2 (30th day).

Results. The study of organ function in recipients of paired kidney allograft who received standard immunosuppressive therapy and therapy in combination with ECP was carried out. The analysis of clinical data did not show statistically significant clinical differences, but in the specific consideration of each pair of cases the tendency to some improvement of the transplant organ engraftment rate in the early terms after the transplant, better survival of the graft and the recipient was revealed. The level of expression of genes involved in immune response regulation (*CD28*, *CTLA4*, *PDL1*, *FOXP3*) and cytokine genes (*TNFA*, *IL1*, *IL2*, *IL10*, *IFNG*) in the studied groups was determined.

Conclusion. According to the results of comparative analysis the level of expression of pro-inflammatory cytokines' genes *IL1*, *IL2* and *IFNG* decreased to 30th day after transplantation. A 30-day comparison between groups shows an increase in the expression level of the *PDL1* and *FOXP3* genes ($p = 0.0009$ and 0.0013 , correspondingly). Increased expression of these genes may be associated with the activation of regulatory T-cells and the development of peripheral tolerance.

Keywords: extracorporeal photopheresis; immune tolerance; expression level analysis; immune response regulation; regulatory T-cells

For correspondence

Alexey B. Zulkarnaev – MD, PhD,
Professor of the Department
of Transplantology, Nephrology
and Artificial Organs
of the Faculty of Advanced Medicine,
Moscow Regional Research
and Clinical Institute
(«MONIKI»), Moscow,
Russian Federation
E-mail: 7059899@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-5405-7887>

Received 06.11.2019. Accepted 16.12.2019.

For citation: Kozlov I.B., Vatazin A.V., Kildushevsky A.V., Zulkarnaev A.B., Fedulkina V.A., Faenko A.P., Yazdovsky V.V., Gudima G.O., Kofidi I.A. Analysis of expression of immune system genes that are responsible for activation and inhibition of T-cell immune response in renal transplant recipients after extracorporeal photochemotherapy. *Immunologiya*. 2020; 41 (1): 20–30. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-20-30 (in Russian)

Funding. Study supported with the grant of the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists No. MD-2253.2018.7.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

По данным отчета Российского трансплантологического общества, потребность в трансплантации почки с каждым годом возрастает. Дефицит донорских органов усугубляется усилением темпов прироста числа пациентов с хронической болезнью почек [1]. В условиях низкой доступности органов технологии сохранения трансплантата в основном базируются на методах фармакологической поддержки. Этот путь достаточно эффективен в плане предотвращения отторжения органа, однако связан с развитием тяжелых осложнений трансплантации, вызванных медикаментозным угнетением иммунной системы реципиента.

В связи с этим востребовано применение новых методов профилактики отторжения трансплантата, базирующихся на механизмах естественной регуляции иммунного ответа и позволяющих снизить фармакологическую нагрузку. Одной из перспективных технологий в этой области является экстракорпоральный фотоферез (ЭКФ), основанный на электромагнитном воздействии на клетки реципиента [2, 3].

ЭКФ считается иммуномодулирующей терапией с несколькими вариантами клинического применения. Первоначально эта технология была разработана R. Edelson и соавт. [4] для лечения Т-клеточной лимфомы (ТКЛ). В 1988 г. применение ЭКФ было одобрено администрацией США по пищевым продуктам и лекарственным средствам (FDA) в качестве стандартной терапии пациентов с прогрессирующей и рефрактерной ТКЛ [5]. В дальнейшем ЭКФ применяли при лечении ряда аутоиммунных заболеваний, в том числе пузырчатки обыкновенной, склеродермии, ревматоидного артрита, болезни Крона и рассеянного склероза [6–13]. Основываясь на положительном клиническом эффекте ЭКФ при терапии аутоиммунных заболеваний, этот метод стали применять для купирования и профилактики реакции острого и хронического отторжения аллотрансплантата солидных органов (печени, сердца, легких), а также с целью купирования острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) после трансплантации стволовых гемопоэтических клеток, устойчивых к традиционной иммуносупрессивной терапии [14–17]. Практически все работы, посвященные изучению эффективности ЭКФ, свидетельствуют о высокой клинической эффективности метода и его безопасности.

ЭКФ состоит из трех основных этапов: сбор мононуклеарных клеток через временный периферический или центральный венозный доступ на клеточном сепараторе, обработка клеток *ex vivo* ультрафиолетовым излучением в присутствии фотосенсибилизатора 8-метоксипсоралена (8-МОР) и, наконец, реинфузия обработанных клеток крови сразу или после суточного инкубационного периода (рис. 1). В процессе ЭКФ молекула 8-МОР, обладающая высокой авидностью к пиримидиновым основаниям нуклеиновых кислот, интеркалирует в молекулы ДНК и РНК. В результате воздействия электромагнитного излучения в ультрафиолетовом диапазоне между ними происходит образование перекрестных связей, приводящих к блокированию синтеза белков с наиболее активно транскрибирующихся молекул мРНК [18].

Несмотря на то что метод ЭКФ давно известен и накоплен опыт его успешного применения, до сих пор нет полного представления о механизме его действия. Предложено несколько не исключających друг друга концепций, реализуемых с участием различных механизмов [19–21]. Несмотря на это, экспериментального подтверждения участия того или иного молекулярного механизма в реализации терапевтического эффекта ЭКФ на сегодняшний день не получено.

Одна из наиболее интересных иммунологических теорий объясняет положительный клинический эффект ЭКФ индукцией специфической толерантности к донорским антигенам. Наиболее чувствительны к воздействию электромагнитного излучения активно делящиеся клетки, вовлеченные в иммунный ответ. Воздействие фотосенсибилизатора приводит к переходу таких клеток в предапоптотное состояние [21, 22]. Реинфузия таких клеток может быть связана как с активацией толерогенных механизмов, так и с развитием специфического иммунного ответа, направленного против клеток активированного фенотипа в организме реципиента [23]. Однако уверенно говорить о справедливости той или иной теории в настоящий момент сложно, поскольку данные о структуре клеточных популяций, изменении профиля экспрессии генов и путях реализации иммунного ответа в организме реципиента и в пуле обрабатываемых мононуклеарных клеток имеют разрозненный, несистемный характер.

В настоящей работе мы попытались прояснить механизмы клинической эффективности ЭКФ, по крайней мере в части иммуногенетической регуляции важных этапов иммунного ответа. В качестве функциональных маркеров нами были выбраны транскрипты генов иммунной системы, вовлеченных в активацию и ингибирование Т-клеточного ответа. В ходе исследования проведен количественный анализ экспрессии генов *CD28*,

CTLA4, PDL1, TNFA, IL1, IL2, IL10, FOXP3 и IFNG. Сравнительная характеристика уровня представленности транскриптов проведена в группах пациентов, проходящих стандартный курс терапии и курс, дополненный процедурами ЭКФ.

Материал и методы

Дизайн исследования и пациенты. Было проведено открытое когортное рандомизированное исследование с участием 20 пациентов, которым была выполнена односторонняя трансплантация трупной почки от неродственного донора. Пациенты были рандомизированы в две группы. В основную группу ($n = 10$) включены 5 мужчин и 5 женщин. Пациенты этой группы помимо иммуносупрессивной терапии получали сеансы ЭКФ. Группу сравнения ($n = 10$) составили 7 мужчин и 3 женщины. Эти пациенты получали только медикаментозную иммуносупрессивную терапию. Чтобы исключить влияние донорских факторов, пациенты двух групп получали парные трансплантаты, причем одну почку получал пациент основной группы, другую – пациент из группы сравнения.

Причины хронической болезни почек у реципиентов обеих групп: хронический гломерулонефрит – 3 и 5 пациентов, хронический пиелонефрит – 3 и 2 пациентов, гипертонический нефросклероз – 2 и 2 пациентов, поликистоз почек – 1 и 0 пациентов, диабетическая нефропатия – 1 и 0 пациентов, аномалия развития мочеполовой системы – 0 и 1 пациент соответственно.

Селекция пар «донор–реципиент» осуществлялась до трансплантации почки подбором по АВ0, результатам прямой перекрестной пробы (cross-match) и тканевого типирования по системе HLA I класса (локусы A, B и C) и II класса (локусы D, DR, DP и DQ) серологическим методом, в соответствии со стандартным протоколом.

У всех пациентов выполняли протокольные биопсии через месяц после трансплантации (выполнено у всех пациентов), а также биопсии *on demand* при развитии дисфункции трансплантата. Морфологическую оценку патологии почечного трансплантата проводили согласно международной классификации Banff 2007 г. [24].

Включение пациентов в исследование осуществлялось с соблюдением процедуры информированного согласия, при наличии адекватного сосудистого доступа для проведения экстракорпоральной методики, отсутствии повышенной чувствительности или аллергии на 8-МОР, гепарин, продукты цитрата и с систолическим артериальным давлением не ниже 90 мм. рт.ст. на момент рандомизации, что связано с особенностями методики проведения ЭКФ.

Иммуносупрессивная терапия. Терапия включала введение базиликсимаба (20 мг) внутривенно до операции и на 4-е сутки после нее. Метилпреднизолон вводился внутривенно капельно во время трансплантации 10 мг/кг, затем на 1 и 4-е сутки по 250 мг. Базисная иммуносупрессивная терапия включала применение такролимуса в стартовой дозе 0,12 мг/кг массы

Рис. 1. Схема проведения ЭКФ

При аферезе получают набор мононуклеарных клеток (МНК). Эритроциты и плазма возвращаются пациенту в конце каждого цикла сбора МНК. В результате афереза получают примерно 150 мл клеточной суспензии, которую затем разбавляют солевым буфером. После добавления фотоактиватора (аммифурина) клеточная суспензия подвергается облучению УФ-лучами в течение 20 мин (фотоактивация) и раствор вводится назад в организм пациента (реинфузия).

тела в сутки. Поддерживались общепринятые целевые концентрации препарата в крови [25]. Микофенолата мофетил применялся в дозе 2 г/сут. Стартовая доза преднизолона составляла 30 мг/сут. При стабильной функции трансплантата с 14-х суток дозу преднизолона снижали по 2,5 мг в течение 3 суток до дозы 20 мг/сут к концу месяца. При развитии острого отторжения трансплантата пациентам проводилась пульс-терапия с внутривенным введением метилпреднизолона по 250 мг в течение 4 последовательных суток. При развитии острого отторжения с гуморальным компонентом помимо пульс-терапии применялся антилимфоцитарный глобулин в дозе 4 мг на 1 кг массы тела и было проведено 3 сеанса каскадной плазмофильтрации.

Процедуры ЭКФ начинали проводить на 3–7-е сутки после трансплантации почки и продолжали по следующей схеме: в первые 2 нед после трансплантации почки – по 2 процедуры в неделю, следующие 6 нед – по 1 процедуре в неделю, в течение 3-го месяца – 1 раз в 2 недели, затем 1 раз в месяц в течение 4, 5 и 6-го месяца после трансплантации. Таким образом, каждый реципиент основной группы получил 15 сеансов ЭКФ в течение 6 мес.

Для фотосенсибилизации использовали аммифурина в дозе 1 мг/кг массы тела, которую пациент принимал за 2–3 ч до начала процедуры забора клеток крови. Сепарацию и накопление мононуклеарных клеток проводили при помощи аппарата Haemonetics MCS+ (США). В течение одной процедуры заготавливали около

40–70 мл концентрата мононуклеарных клеток. Затем полученный концентрат клеток ресуспендировали в 200 мл 0,9 % раствора хлористого натрия. Клеточную взвесь подвергали воздействию ультрафиолетового освещения при длине волны 320–400 нм. Общая доза экспозиции составляла 0,8–1,2 Дж/см². После 90 мин инкубации при температуре 20–24 °С клетки реинфузировались пациенту в течение 30 мин.

Анализ уровня экспрессии генов осуществлялся в два этапа: выделение мРНК и постановка полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени. Подбор генов для включения в исследование осуществляли с помощью базы данных биохимических путей KEGG (Kanehisa Laboratories, Университет Киото, Япония) [26].

Подготовка образцов для иммуногенетического обследования. Для выделения мРНК использовали наборы «Проба НК» (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия). Метод основан на лизисе клеток в 4М растворе гуанидинтиоцианата и осаждении нуклеиновых кислот изопропанолом в присутствии соосадителя с последующими отмывками этанолом и ацетоном. В ряде случаев для выделения РНК использовали реагент Trizol (Qiagen, США). Перед обработкой лизирующим раствором мононуклеары периферической крови разделяли на градиенте плотностей с использованием пробирок SepMate (Stemcell, США).

Проведение ОТ-ПЦР. Для оценки профиля экспрессии генов была использована технология относительного анализа количества мРНК в образцах с помощью реакции обратной транскрипции и последующей ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени).

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Поскольку на низких температурах возможно образование димеров праймеров и неспецифических продуктов амплификации при постановке ПЦР была использована технология «горячего» старта, который обеспечивается применением модифицированной Taq-полимеразы с активным центром, инактивированной молекулой антитела. При достижении температур, оптимальных для отжига праймеров, происходит диссоциация комплекса «фермент–антитело» и активный центр освобождается (ООО «НПФ ДНК-Технология, Россия).

Реакцию обратной транскрипции (синтез кДНК на полученной РНК) проводили в объеме 40 мкл. В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали специфические олигонуклеотиды и обратную транскриптазу М-MuLV («Евроген», Россия). Реакцию проводили при температуре 40 °С в течение 30 мин с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95 °С в течение 5 мин. Амплификацию осуществляли

в режиме реального времени с измерением уровня флюоресценции по каналу FAM на каждом цикле при температуре отжига праймеров.

Уровень экспрессии оценивали методом сравнения пороговых циклов (метод $\Delta\Delta C_q$ с нормировкой на референсные гены). Для каждого образца на основании уровней экспрессии 2 референсных генов (гены *HPRT* и *TBP*) вычислялся нормировочный фактор (NF) – среднее арифметическое значений C_p референсных генов.

$$NF = \frac{1}{2} (C_{p(tbp)} + C_{p(hprt1)}).$$

Относительное значение экспрессии гена *x* вычислялось по формуле:

$$Expression(X) = 2^{-(C_{p(x)} - NF)}.$$

Статистическую обработку результатов исследования уровней экспрессии генов проводили с использованием методов непараметрического анализа. Исследованные количественные показатели представляются в виде *Me* (L–H), где *Me* – медиана, L – нижний квартиль, H – верхний квартиль. Значения *Me* в группе сравнения были приняты за 1, а значения *Me* в исследуемой группе показывали, во сколько раз уровень экспрессии гена выше или ниже по отношению к соответствующим показателям в группе сравнения. Для сопоставления двух групп по количественным признакам использован *U*-критерий Манна–Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Были установлены следующие контрольные точки исследования: 1) 1–4-е сутки (после начала медикаментозной иммуносупрессивной терапии, но до начала процедур ЭКФ в основной группе); 2) 30-е сутки после трансплантации.

Результаты

Клинические результаты

У пациентов основной группы по клинико-лабораторным признакам, а также по результатам гистологического исследования биоптатов не выявлено признаков отторжения. В группе сравнения в раннем послеоперационном периоде клинически было диагностировано острое отторжение трансплантата, которое подтверждено гистологическим исследованием – отторжение преимущественно по гуморальному типу (свечение C4d-компонента комплемента при иммунофлюоресценции) [24]. Несмотря на проведенную противокризовую терапию, функция трансплантата была утрачена полностью.

Инфекционных осложнений в основной группе не отмечалось. В группе сравнения один пациент перенес пневмонию, потребовавшую стационарного лечения. Инфекционный процесс был полностью купирован.

Таблица 1. Основные характеристики генов, включенных в исследование

Ген	Локализация гена	мРНК		Адресация ДНК
		референс-последовательность	варианты альтернативного сплайсинга	
<i>IL1B</i>	2q14	NM_000576.2	нет	NC_000002.11
<i>IL2</i>	4q26-q27	NM_000586.3	нет	NC_000004.11
<i>CD28</i>	2q33.2	NM_006139.4	есть	NC_000002.12
<i>CTLA4</i>	2q33.2	NM_001037631.3	есть	NC_000002.12
<i>PDL1</i>	9p24.1	NM_001267706.1	есть	NC_000009.12
<i>TNF</i>	6p21.3	NM_000594.2	нет	NC_000006.11
<i>IFNG</i>	12q14	NM_000619.2	нет	NC_000012.11
<i>FOXP3</i>	Xp11.23	NM_014009.3	есть	NC_000023.10
<i>HPRT1</i>	Xq26.1	NM_000194.1	нет	NC_000023.9
<i>TBP</i>	6q27	NM_003194.4	есть	NC_000006.11

У другого пациента из группы сравнения течение пневмонии было неблагоприятным: в результате развития дыхательной недостаточности и развернутой клинической картины сепсиса пациент умер на 58-е сутки после трансплантации.

У двух пациентов, получивших парные трансплантаты, функция трансплантата отсутствовала в течение месяца. При гистологическом исследовании выявлена донорская патология: выраженный гипертонический нефроангиосклероз. Трансплантаты были удалены.

У одного пациента из основной группы с дисфункцией трансплантата при гистологическом исследовании выявлены остаточные признаки острого тубулярного некроза и *de novo* – IgA-нефропатия.

Анализ экспрессии генов

Гены для исследования были подобраны таким образом, чтобы охватить ключевые функциональные этапы, вовлеченные в реализацию иммунного ответа, в том числе при развитии реакции отторжения трансплантата и/или развитии РТПХ: *IL1* – провоспалительное действие, активация Т-клеточного ответа, дифференцировка Th17-клеток, передача сигнала по MAPK-, ФНО- и NF-κB-опосредованным путям; *IL2* – провоспалительное действие, активация Т-клеточного ответа, дифференцировка Th1-, Th2-, Th17-клеток, передача сигнала по PI3K- и JAK-STAT-опосредованным путям; *IFNG* – провоспалительное действие, активация клеточного иммунитета, дифференцировка Th1-, Th2-, Th17-клеток, передача сигнала по HIF-1- и TФРβ-опосредованным путям; *TNFA* – провоспалительное действие, передача сигнала по MAPK-, NF-κB-, mTOR-, ФНО-, TФРβ-опосредованным путям, процессинг и презентация антигенов, *FOXP3* – важнейший маркер активации регуляторных клеток. Кроме того, в исследование взяты гены *CD28*, *CTLA4* и *PDL1*, кодирующие коstimуляторные рецепторы, регулирующие клеточную адгезию, осуществляющие взаимодействие с рецепторами антиген-презентирующих клеток и принимающие участие в передаче сигнала через рецептор Т-клеток [26]. Основные характеристики генов, включенных в исследование приведены в табл. 1.

Для анализа уровня экспрессии генов использовали вариант полимеразной цепной реакции, основанный на регистрации продуктов ПЦР в режиме реального времени. В исследовании использовали оригинальные праймеры и ДНК-зонды, обеспечивающие специфическую обратную транскрипцию и полимеразную цепную реакцию. Для корректной оценки уровня экспрессии исследуемых генов принципиальное значение имеет выбор нормировочных генов. Следует учитывать, что гены, выбранные в качестве нормировочных, могут по-разному экспрессироваться в разных тканях и даже в пределах одной ткани. Если учесть, что сам метод также имеет ошибку, представляется целесообразным проведение нормировки по нескольким генам. В данной работе для этой цели были выбраны два гена «домашнего хозяйства» (housekeeping genes) – ген гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (*HPRT1*) и ген ТАТА-связывающего протеина (*TBP*).

Рис. 2. Значение нормированного показателя экспрессии генов при сравнении исследованных групп в точке 1 (индекс _1) и в точке 2 (индекс _2)

Рис. 3. Значение нормированного показателя экспрессии генов при сравнении исследованных групп

A – сопоставление основной группы (*fht*) и группы сравнения (*nfht*) по экспрессии гена *PDL1* ($p = 0,0009$); *Б* – сопоставление по экспрессии гена *FOXP3* ($p = 0,0013$).

При сравнении обследованных групп в точке 1 (1–4-й день) и в точке 2 (30-й день) было отмечено понижение уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов *IL1*, *IL2* и *IFNG* к 30-м суткам после трансплантации. В то же время экспрессия генов *PDL1* и *FOXP3*, регулирующих развитие регуляторного ответа, существенно повысилась к 30-му дню после трансплантации (рис. 2). Корреляции уровня экспрессии генов с наличием/отсутствием эпизодов отторжения трансплантата не установлено.

Для оценки влияния процедуры ЭКФ на экспрессию включенных в исследование генов было проведено сравнение уровня представленности транскриптов у пациентов, получавших стандартную иммунотерапию

и иммунотерапию в комплексе с процедурами ЭКФ. При сопоставлении показателей основной группы и группы сравнения в пределах точки 2 установлено достоверное увеличение экспрессии этих генов в группе пациентов, прошедших процедуру ЭКФ ($p = 0,0009$ и $0,0013$ соответственно). Результаты сравнительного анализа экспрессии генов *PDL1* и *FOXP3* в исследованных группах приведены на рис. 3.

Обсуждение

Детальный анализ клинической эффективности ЭКФ с длительным периодом наблюдения был проведен нами ранее [27, 28]. Было показано, что ЭКФ позволяет снизить риск отторжения, утраты трансплантата, инфекционных осложнений и улучшить функцию трансплантата в позднем послеоперационном периоде (что подтверждается динамикой азотемии, скорости клубочковой фильтрации и протеинурии). В данном исследовании мы ограничились кратким анализом событий, которыми считали инфекционное осложнение, требующее стационарного лечения, отторжение трансплантата, стойкую дисфункцию трансплантата вследствие *de novo* или донорской патологии, а также утрату трансплантата и смерть реципиента. Основное внимание мы сосредоточили на изучении генетических механизмов ингибирования иммунного ответа у реципиентов почечного трансплантата на фоне ЭКФ.

Анализ клинических показателей не выявил значимых отличий в функциональном состоянии трансплантата в исследованных группах. Однако при конкретном рассмотрении каждого парного случая обнаружена тенденция к некоторому улучшению скорости приживления пересаженного органа в ранние сроки после пересадки у пациентов, прошедших процедуру ЭКФ. Более того, основываясь на нашем опыте проведения процедур ЭКФ, можно с уверенностью говорить о лучшей выживаемости трансплантата и реципиента в отдаленные сроки после трансплантации [29].

Несмотря на то что количество событий у пациентов группы сравнения было больше (5 против 2 в основной группе), статистически значимых различий клинических результатов мы не отметили. Это объясняется небольшим объемом выборки и коротким периодом наблюдения. Трансплантаты в основной группе были утрачены вследствие развития донорской патологии и возвратной патологии реципиента. Донорская патология трансплантата является редким явлением, однако в условиях дефицита донорских органов и использования почек, полученных от субоптимальных доноров, данный тип патологии становится более частой причиной утраты функции трансплантата [30]. Возвратная патология реципиента также относится к редким событиям раннего послеоперационного периода. Частота возвратной патологии в трансплантированной почке колеблется от 1 до 11 % [31].

Основным методом купирования отторжения в настоящее время является иммуносупрессивная терапия. Иммуносупрессия на основе применения такролимуса

значительно повышает выживаемость реципиентов трансплантата. Однако такролимус имеет узкий терапевтический индекс и демонстрирует различную фармакокинетику на индивидуальном уровне. Рекомендации по дозировке и целевой концентрации такролимуса варьируют в различных медицинских учреждениях, а большая фармакокинетическая вариабельность затрудняет прогнозирование клинического эффекта при том или ином режиме иммуносупрессии. При этом пониженная концентрация такролимуса в крови может привести к отторжению органа, а слишком высокая может спровоцировать нефро- и нейротоксический эффект [32, 33]. Учитывая положительный опыт применения ЭКФ, данный метод можно рассматривать как дополнительный к стандартной иммуносупрессивной терапии с возможностью постепенного снижения дозировки иммуносупрессивного компонента на основе объективных клинических показателей.

Основной целью работы было изучение механизма действия ЭКФ. Ранее нами было показано [34], что одним из основных путей ингибирования иммунного ответа с помощью ЭКФ в раннем послеоперационном периоде может выступать антиген-специфическое переключение второго коактивационного сигнала по CD80/86-CD28-пути на ингибирующий CD80/86-CTLA4-путь вследствие снижения плотности экспрессии молекулы CD28 на наивных CD4⁺-Т-клетках, а также доли наивных CD4⁺-Т-клеток, экспрессирующих эту молекулу. В дальнейшем выраженность этого эффекта уменьшается и уровень экспрессии молекулы CD28 между группами практически уравнивается. В более позднем периоде эффект ЭКФ может достигаться в результате увеличения количества антиген-специфических Т-регуляторных клеток (Treg). Их важная роль в поддержании иммунной толерантности при трансплантации подтверждена многими исследованиями [35–37]. Есть свидетельства, что увеличение субпопуляции CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-Treg может сохраняться в течение 3 и даже 12 мес после курса ЭКФ и дольше [38].

Регуляторные клетки составляют от 3 до 10 % периферических CD4⁺-клеток. Они характеризуются экспрессией маркеров CD25 (рецептор ИЛ-2) и FOXP3 (ключевой регулятор развития и функционирования Treg) и способны подавлять иммунный ответ на собственные и чужеродные антигены. Баланс между эффекторными и регуляторными клетками необходим для правильной регуляции адаптивного иммунного ответа. Нарушение этого баланса приводит к развитию иммунозависимой патологии. Таким образом, уровень Treg является важным клиническим показателем, позволяющим оценивать эффективность терапии и принимать решение о ее модификации, в частности об ослаблении иммуносупрессирующего компонента. Так, Н.А. Denney с соавт. показано, что количество Treg фенотипа CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127^{dim/-} значительно возрастает в отдаленном периоде после ЭКФ [39]. В некоторых случаях повышение количества клеток регуляторного фенотипа рассматривается в качестве

протективного фактора, препятствующего развитию дисфункции трансплантата [40]. Кроме того, показано, что увеличение пула Treg приводит к снижению разнообразия стимулированных эффекторных клеток, что может быть одним из важных механизмов индукции толерантности [41]. Таким образом, установленное нами повышение уровня экспрессии FOXP3 подтверждает возможность ЭКФ-опосредованной индукции толерантности и позволяет рассматривать данный транскрипт как перспективный маркер оценки эффективности терапии.

В свою очередь, повышенная экспрессия PDL1 может свидетельствовать об активном развитии иммунного ответа. Подавление экспрессии CD28 приводит к переключению взаимодействия экспрессирующихся на поверхности антиген-презентирующих клеток молекул класса В7 (CD80/86) на CTLA4 и PD-1 [25]. Конкурентное ингибирование CD80/86 ограничивает Т-клеточную активацию, терминирует лимфоцитарный ответ, приводит к подавлению экспрессии провоспалительных цитокинов и способствует индукции иммунной толерантности к презентуемым антигенам. Отдельный интерес полученные данные представляют в связи с отмеченным ранее участием PD-L1 в радиационно-индуцированной стимуляции регуляторного иммунного ответа. В частности, было показано, что повышенная экспрессия PD-1/PD-L1 приводит к снижению активации STAT в Th1-клетках, их трансформации в Treg и подавлению РТПХ [42].

При этом, до сих пор не выяснен вопрос разнообразия Treg как фактора, влияющего на эффективность индукции толерантности. В нормальных физиологических условиях популяция Treg экспрессирует значительное разнообразие Т-клеточных рецепторов (TCR), которые лишь в небольшой степени перекрываются с репертуаром остальных Т-лимфоцитов [43]. Однако, как показано в ряде исследований, решающую роль в формировании толерантности при воздействии конкретного антигена может играть лишь небольшая популяция специфических клеток [44–46]. Если индукция толерантности действительно происходит за счет узкоспециализированных клонов регуляторных клеток, установление этих клонов позволит значительно продвинуться в разработке методов клеточной терапии отторжения [47, 48].

Заключение

В данном исследовании проанализированы особенности функционирования ключевых компонентов клеточного иммунного ответа в условиях действия ЭКФ. В частности, были изучены молекулярные механизмы, лежащие в основе клинического эффекта ЭКФ на генетическом уровне в группах реципиентов аллогенного почечного трансплантата. Полученные результаты указывают на ЭКФ-опосредованную активацию толерогенных механизмов и потенциально могут быть использованы для модификации иммуносупрессивной терапии.

■ Литература

1. Готье С.В., Хомяков С.М. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2016 году IX. Сообщение регистра Российского трансплантологического общества. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2017; 19 (2): 6–26.
2. Couriel D.R., Hosing C., Saliba R., Shpall E.J., Anderlini P., Rhodes B., Smith V., Khouri I., Giral S., De Lima M. et al. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of steroid-resistant chronic GVHD. *Blood*. 2006; 107: 3074–80.
3. Marques M.B., Tuncer H.H. Photopheresis in solid organ transplant rejection. *Journal of Clinical Apheresis*. 2006; 21: 72–7.
4. Edelson R., Berger C., Gasparro F., Jegasothy B., Heald P., Wintroub B., Vonderheid E., Knobler R., Wolff K., Plewig G. et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *New England Journal of Medicine*. 1987; 316: 297–303.
5. Edelson R.L. Mechanistic insights into extracorporeal photochemotherapy: efficient induction of monocyte-to-dendritic cell maturation. *Transfusion and Apheresis Science*. 2014; 50: 322–29.
6. Cavaletti G., Perseghin P., Dassi M., Cavarretta R., Frigo M., Caputo D., Stanzani L., Tagliabue E., Zoia C., Grimaldi M. et al. Extracorporeal photochemotherapy: a safety and tolerability pilot study with preliminary efficacy results in refractory relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurological Sciences*. 2006; 27: 24–32.
7. Knobler R.M., French L.E., Kim Y., Bisaccia E., Graninger W., Nahavandi H., Strobl F.J., Keystone E., Mehlmauer M., Rook A.H. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of photopheresis in systemic sclerosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2006; 54: 793–9.
8. Macheiner W., Jantschitsch C., Graninger W., Pálóczy K., Bálint G., Marschalkó M., Kainberger F., Breier F., Knobler R.M. Sézary syndrome and seronegative polyarthritis: treatment with extracorporeal photochemotherapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003; 48: 220–6.
9. Menkes C., Andreu G., Heshmati F., Hilliquin P. Extracorporeal photochemotherapy. *Rheumatology*. 1992; 31: 789–90.
10. Reinisch W., Nahavandi H., Santella R., Zhang Y., Gasche C., Moser G., Waldhör T., Gangl A., Vogelsang H., Knobler R. Extracorporeal photochemotherapy in patients with steroid-dependent Crohn's disease: a prospective pilot study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2001; 15: 1313–22.
11. Rook A.H., Freundlich B., Jegasothy B.V., Perez M.I., Barr W.G., Jimenez S.A., Rietschel R.L., Wintroub B., Kahaleh M.B., Varga J. et al. Treatment of systemic sclerosis with extracorporeal photochemotherapy: results of a multicenter trial. *Archives of dermatology*. 1992; 128: 337–46.
12. Rook A.H., Jegasothy B.V., Heald P., Nahass G.T., Ditre C., Witmer W.K., Lazarus G.S., Edelson R.L. Extracorporeal photochemotherapy for drug-resistant pemphigus vulgaris. *Annals of internal medicine*. 1990; 112: 303–5.
13. Saraceno R., Ruzzetti M., Lanti A., Marinacci M., Chimenti S. Therapeutic options in an immunocompromised patient with pemphigus vulgaris: potential interest of plasmapheresis and extracorporeal photochemotherapy. *European Journal of Dermatology*. 2008; 18: 354–6.
14. Barr M.L., Meiser B.M., Eisen H.J., Roberts R.F., Livi U., Dall'Amico R., Dorent R., Rogers J.G., Radovančević B., Taylor D.O. et al. Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. *New England Journal of Medicine*. 1998; 339: 1744–51.
15. Greinix H.T., Volc-Platzer B., Rabitsch W., Gmeinhardt B., Guevara-Pineda C., Kalhs P., Krutmann J., Hönigsmann H., Ciofica M., Knobler R.M. Successful use of extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe acute and chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 1998; 92: 3098–104.
16. Salvaneschi L., Perotti C., Zecca M., Bernuzzi S., Viarengo G., Giorgiani G., Del Fante C., Bergamaschi P., Maccario R., Pession A. et al. Extracorporeal photochemotherapy for treatment of acute and chronic GVHD in childhood. *Transfusion*. 2001; 41: 1299–305.
17. Urbani L., Mazzoni A., Catalano G., De Simone P., Vanacore R., Pardi C., Bortoli M., Biancofiore G., Campani D., Perrone V. et al. The use of extracorporeal photopheresis for allograft rejection in liver transplant recipients. In: *Transplantation Proceedings*. 2004; Elsevier: 3068–70.
18. Heshmati F. Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy. *Transfusion and apheresis science*. 2003; 29: 61–70.
19. Gorgun G., Miller K.B., Foss F.M. Immunologic mechanisms of extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2002; 100: 941–7.
20. Krutmann J., Morita A., Elmets C.A. Mechanisms of photo (chemo) therapy. In: *Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods*. 2001; Springer: 54–68. DOI: 10.1007/978-3-540-36693-5_2
21. Yoo E.K., Rook A.H., Elenitsas R., Gasparro F.P., Vowels B.R. Apoptosis induction by ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action. *Journal of Investigative Dermatology*. 1996; 107: 235–42.
22. Marks D.I., Fox R.M. Mechanisms of photochemotherapy-induced apoptotic cell death in lymphoid cells. *Biochemistry and cell biology*. 1991; 69: 754–60.
23. Hannani D. Extracorporeal photopheresis: tolerogenic or immunogenic cell death? Beyond current dogma. *Frontiers in immunology*. 2015; 6: 349.
24. Solez K., Colvin R., Racusen L.C., Haas M., Sis B., Mengel M., Halloran P., Baldwin W., Banfi G., Collins A. et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *American journal of transplantation*. 2008; 8: 753–60.
25. Трансплантология. Фармакотерапия без ошибок. Руководство для врачей. Ред. Готье С.В., Мойсюк Я.Г. Москва : Е-ното, 2014: 432 с.
26. URL: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
27. Ватазин А.В., Зулькарнаев А.Б., Кильдюшевский А.В., Федулкина В.А., Крстич М. Некоторые механизмы действия экстракорпоральной фотохимиотерапии при трансплантации солидных органов. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2014; 16 (1): 76–84.
28. Федулкина В., Ватазин А., Кильдюшевский А., Зулькарнаев А., Кантария Р. Экстракорпоральная фотохимиотерапия как предупреждение отторжения трансплантата в сочетании со снижением частоты инфекционных осложнений у урологических больных. Урология. 2015; 6: 47–51.
29. Федулкина В.А., Ватазин А., Кильдюшевский А., Ольшанский А., Фаенко, А. Значение экстракорпоральной фотохимиотерапии в ингибировании процессов отторжения почечного трансплантата. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2016; 18 (2): 46–55.
30. Watson C.J., Johnson R.J., Birch R., Collett D., Bradley J.A. A simplified donor risk index for predicting outcome after deceased donor kidney transplantation. *Transplantation*. 2012; 93: 314–8.
31. Reese P.P., Shults J., Bloom R.D., Mussell A., Harhay M.N., Abt P., Levine M., Johansen K.L., Karlawish J.T., Feldman H.I. Functional status, time to transplantation, and survival benefit of kidney transplantation among wait-listed candidates. *American Journal of Kidney Diseases*. 2015; 66: 837–45.
32. Staats C.E., Tett S.E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clinical pharmacokinetics*. 2004; 43: 623–53.
33. Venkataramanan R., Shaw L.M., Sarkozi L., Mullins R., Pirsch J., MacFarlane G., Scheller D., Ersfeld D., Frick M., Fitzsimmons W.E. et al. Clinical utility of monitoring tacrolimus blood concentrations in liver transplant patients. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2001; 41: 542–51.
34. Фаенко А.П., Зулькарнаев А., Чуксина Ю., Федулкина В., Кантария Р., Кильдюшевский А., Ватазин А. Отдаленные результаты профилактического применения фотофереза при трансплантации почки. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2018; 20 (1): 55–65.
35. Lamioni A., Parisi F., Isacchi G., Giorda E., Di Cesare S., Landolfo A., Cenci F., Bottazzo G.F., Carsetti R. The immunological effects of extracorporeal photopheresis unraveled: induction of tolerogenic dendritic cells *in vitro* and regulatory T cells *in vivo*. *Transplantation*. 2005; 79: 846–50.
36. Meloni F., Cascina A., Miserere S., Perotti C., Vitulo P., Fietta A. Peripheral CD4⁺ CD25⁺ TREG cell counts and the response to extracorporeal photopheresis in lung transplant recipients. In: *Transplantation Proceedings*. 2007; Elsevier: 213–7.
37. Xia C.-Q., Campbell K.A., Clare-Salzler M.J. Extracorporeal photopheresis-induced immune tolerance: a focus on modulation of antigen-presenting cells and induction of regulatory T cells by apoptotic cells. *Current opinion in organ transplantation*. 2009; 14: 338.
38. Siedlecki A., Irish W., Brennan D.C. Delayed graft function in the kidney transplant. *American journal of transplantation*. 2011; 11: 2279–96.
39. Denney H.A., Whittle R.J., Lai J., Jacques R.M., Taylor P.C. Regulatory T cells in chronic graft-versus-host disease after extracor-

poreal photopheresis: correlation with skin and global organ responses, and ability to taper steroids. *Transplantation*. 2017; 101: 204–11.

40. Salman J., Ius F., Knoefel A.-K., Sommer W., Siemeni T., Kuehn C., Tudorache I., Aysar M., Nakagiri T., Preissler G. et al. Association of Higher CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, FoxP3⁺, and IL-2⁺ T Cell Frequencies Early After Lung Transplantation With Less Chronic Lung Allograft Dysfunction at Two Years. *American Journal of Transplantation*. 2017; 17: 1637–48.

41. Fontaine M., Vogel I., Van Eyck Y.-R., Galuppo A., Ajouaou Y., Decaestecker C., Kassiotis G., Moser M., Leo O. Regulatory T cells constrain the TCR repertoire of antigen-stimulated conventional CD4 T cells. *The EMBO Journal*. 2018; 37: 398–412.

42. Amarnath S., Mangus C.W., Wang J.C., Wei F., He A., Kapoor V., Foley J.E., Massey P.R., Felizardo T.C., Riley J.L. and Levine B.L. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Science translational medicine*. 2011; 3 (111): 111ra120. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003130

43. Yu A., Dee M.J., Adeegbe D., Dwyer C.J., Altman N.H., Malek T.R. The lower limit of regulatory CD4⁺ Foxp3⁺ TCRβ repertoire diversity required to control autoimmunity. *The Journal of Immunology*. 2017; 198: 3127–35.

■ References

1. Gautier S.V., Khomyakov S.M. Organ donation and transplantation in the Russian Federation in 2016 9th report of the National Registry. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2017; 19 (2): 6–26.

2. Couriel D.R., Hosing C., Saliba R., Shpall E.J., Anderlini P., Rhodes B., Smith V., Khouri I., Giral S., De Lima M., et al. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of steroid-resistant chronic GVHD. *Blood*. 2006; 107: 3074–80.

3. Marques M.B., Tuncer H.H. Photopheresis in solid organ transplant rejection. *Journal of Clinical Apheresis*. 2006; 21: 72–7.

4. Edelson R., Berger C., Gasparro F., Jegasothy B., Heald P., Wintroub B., Vonderheid E., Knobler R., Wolff K., Plewig G., et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *New England Journal of Medicine*. 1987; 316: 297–303.

5. Edelson R.L. Mechanistic insights into extracorporeal photochemotherapy: efficient induction of monocyte-to-dendritic cell maturation. *Transfusion and Apheresis Science*. 2014; 50: 322–29.

6. Cavaletti G., Perseghin P., Dassi M., Cavarretta R., Frigo M., Caputo D., Stanzani L., Tagliabue E., Zoia C., Grimaldi M., et al. Extracorporeal photochemotherapy: a safety and tolerability pilot study with preliminary efficacy results in refractory relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurological Sciences*. 2006; 27: 24–32.

7. Knobler R.M., French L.E., Kim Y., Bisaccia E., Graninger W., Nahavandi H., Strobl F.J., Keystone E., Mehlmauer M., Rook A.H., et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of photopheresis in systemic sclerosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2006; 54: 793–9.

8. Macheiner W., Jantschits C., Graninger W., Pálóczy K., Bálint G., Marschalkó M., Kainberger F., Breier F., Knobler R.M. Sézary syndrome and seronegative polyarthritis: treatment with extracorporeal photochemotherapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003; 48: 220–6.

9. Menkes C., Andreu G., Heshmati F., Hilliquin P. Extracorporeal photochemotherapy. *Rheumatology*. 1992; 31: 789–90.

10. Reinisch W., Nahavandi H., Santella R., Zhang Y., Gasche C., Moser G., Waldhör T., Gangl A., Vogelsang H., Knobler R. Extracorporeal photochemotherapy in patients with steroid-dependent Crohn's disease: a prospective pilot study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2001; 15: 1313–22.

11. Rook A.H., Freundlich B., Jegasothy B.V., Perez M.I., Barr W.G., Jimenez S.A., Rietschel R.L., Wintroub B., Kahaleh M.B., Varga J., et al. Treatment of systemic sclerosis with extracorporeal photochemotherapy: results of a multicenter trial. *Archives of dermatology*. 1992; 128: 337–46.

12. Rook A.H., Jegasothy B.V., Heald P., Nahass G.T., Ditre C., Witmer W.K., Lazarus G.S., Edelson R.L. Extracorporeal photochemotherapy for drug-resistant pemphigus vulgaris. *Annals of internal medicine*. 1990; 112: 303–5.

13. Saraceno R., Ruzzetti M., Lanti A., Marinacci M., Chimenti S. Therapeutic options in an immunocompromised patient with pemphigus vulgaris: potential interest of plasmapheresis and extracorporeal photochemotherapy. *European Journal of Dermatology*. 2008; 18: 354–6.

44. Golshayan D., Jiang S., Tsang J., Garin M.I., Mottet C., Lechler R.I. *In vitro*-expanded donor alloantigen-specific CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*. 2007; 109: 827–35.

45. Nishimura E., Sakihama T., Setoguchi R., Tanaka K., Sakaguchi S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by *in vivo* and *in vitro* antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells. *International immunology*. 2004; 16: 1189–201.

46. Sagoo P., Ali N., Garg G., Nestle F.O., Lechler R.I., Lombardi G. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Science translational medicine*. 2011; 3: 83ra42–83ra42.

47. Long E., Wood K.J. Regulatory T cells in transplantation: transferring mouse studies to the clinic. *Transplantation*. 2009; 88: 1050–56.

48. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Трофимов Д.Ю., Кофиади И.А., Алексеева П.Л. Иммуногенетика и трансплантация кроветворных стволовых клеток. *Иммунология*. 2017; (38) 4: 184–92.

14. Barr M.L., Meiser B.M., Eisen H.J., Roberts R.F., Livi U., Dall'Amico R., Dorent R., Rogers J.G., Radovančević B., Taylor D.O., et al. Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. *New England Journal of Medicine*. 1998; 339: 1744–51.

15. Greinix H.T., Volc-Platzter B., Rabitsch W., Gmeinhardt B., Guevara-Pineda C., Kalhs P., Krutmann J., Hönigsmann H., Ciovia M., Knobler R.M. Successful use of extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe acute and chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 1998; 92: 3098–104.

16. Salvaneschi L., Perotti C., Zecca M., Bernuzzi S., Viarengo G., Giorgiani G., Del Fante C., Bergamaschi P., Maccario R., Pession A., et al. Extracorporeal photochemotherapy for treatment of acute and chronic GVHD in childhood. *Transfusion*. 2001; 41: 1299–305.

17. Urbani L., Mazzoni A., Catalano G., De Simone P., Vanacore R., Pardi C., Bortoli M., Biancufiore G., Campani D., Perrone V., et al. The use of extracorporeal photopheresis for allograft rejection in liver transplant recipients. In: *Transplantation Proceedings*. 2004; Elsevier: 3068–70.

18. Heshmati F. Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy. *Transfusion and apheresis science*. 2003; 29: 61–70.

19. Gorgun G., Miller K.B., Foss F.M. Immunologic mechanisms of extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2002; 100: 941–7.

20. Krutmann J., Morita A., Elmetts C.A. Mechanisms of photo (chemo) therapy. In: *Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods*. 2001; Springer: 54–68. DOI: 10.1007/978-3-540-36693-5_2

21. Yoo E.K., Rook A.H., Elenitsas R., Gasparro F.P., Vowels B.R. Apoptosis induction by ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action. *Journal of Investigative Dermatology*. 1996; 107: 235–42.

22. Marks D.I., Fox R.M. Mechanisms of photochemotherapy-induced apoptotic cell death in lymphoid cells. *Biochemistry and cell biology*. 1991; 69: 754–60.

23. Hannani D. Extracorporeal photopheresis: tolerogenic or immunogenic cell death? Beyond current dogma. *Frontiers in immunology*. 2015; 6: 349.

24. Solez K., Colvin R., Racusen L.C., Haas M., Sis B., Mengel M., Halloran P., Baldwin W., Banfi G., Collins A., et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *American journal of transplantation*. 2008; 8: 753–60.

25. *Transplantation. Pharmacotherapy without errors. A guide for physicians*. Eds. Gautier S.V., Moisyuk Ya.G. Moscow : E-Noto; 2014: 432 p.

26. URL: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>

27. Vatazin A.V., Zul'karnayev A.B., Kil'dyushevskij A.V., Fedulkina V.A., Krstic M. Some of the mechanisms of extracorporeal photochemotherapy in solid organ transplantation. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2014; 16 (1): 76–84. (in Russian)

28. Fedulkina V., Vatazin A., Kil'dyushevskiy A., Zul'karnayev A., Kantariya R. Extracorporeal photochemotherapy as prevention of graft rejection, coupled with declining infectious complications rates in urological patients. *Urologiia*. 2015; 6: 47–51. (in Russian)

29. Fedulkina V.A., Vatazin A.V., Kildyushevsky A.V., Olshansky A.Y., Faenko A.P. The value of extracorporeal photopheresis in renal transplant rejection inhibition. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2016; 18 (2): 46–55. (in Russian)
30. Watson C.J., Johnson R.J., Birch R., Collett D., Bradley J.A. A simplified donor risk index for predicting outcome after deceased donor kidney transplantation. *Transplantation*. 2012; 93: 314–8.
31. Reese P.P., Shults J., Bloom R.D., Mussell A., Harhay M.N., Abt P., Levine M., Johansen K.L., Karlawish J.T., Feldman H.I. Functional status, time to transplantation, and survival benefit of kidney transplantation among wait-listed candidates. *American Journal of Kidney Diseases*. 2015; 66: 837–45.
32. Staatz C.E., Tett S.E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clinical pharmacokinetics*. 2004; 43: 623–53.
33. Venkataraman R., Shaw L.M., Sarkozi L., Mullins R., Pirsch J., MacFarlane G., Scheller D., Ersfeld D., Frick M., Fitzsimmons W.E. et al. Clinical utility of monitoring tacrolimus blood concentrations in liver transplant patients. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2001; 41: 542–51.
34. Faenko A.P., Zulkarnayev A.B., Chuksina J.J., Fedulkina V.A., Kantaria R.O., Kildyushevskiy A.V., Vatazin A.V. Long-term outcomes of prophylaxis application of photopheresis in kidney transplantation. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2018; 20 (1): 55–65. (in Russian)
35. Lamioni A., Parisi F., Isacchi G., Giorda E., Di Cesare S., Landolfo A., Cenci F., Bottazzo G.F., Carsetti R. The immunological effects of extracorporeal photopheresis unraveled: induction of tolerogenic dendritic cells *in vitro* and regulatory T cells *in vivo*. *Transplantation*. 2005; 79: 846–50.
36. Meloni F., Cascina A., Miserere S., Perotti C., Vitulo P., Fietta A. Peripheral CD4⁺ CD25⁺ TREG cell counts and the response to extracorporeal photopheresis in lung transplant recipients. In: *Transplantation Proceedings*. 2007; Elsevier: 213–7.
37. Xia C.-Q., Campbell K.A., Clare-Salzler M.J. Extracorporeal photopheresis-induced immune tolerance: a focus on modulation of antigen-presenting cells and induction of regulatory T cells by apoptotic cells. *Current opinion in organ transplantation*. 2009; 14: 338.
38. Siedlecki A., Irish W., Brennan D.C. Delayed graft function in the kidney transplant. *American journal of transplantation*. 2011; 11: 2279–96.
39. Denney H.A., Whittle R.J., Lai J., Jacques R.M., Taylor P.C. Regulatory T cells in chronic graft-versus-host disease after extracorporeal photopheresis: correlation with skin and global organ responses, and ability to taper steroids. *Transplantation*. 2017; 101: 204–11.
40. Salman J., Ius F., Knoefel A.-K., Sommer W., Siemeni T., Kuehn C., Tudorache I., Avsar M., Nakagiri T., Preissler G., et al. Association of Higher CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, FoxP3⁺ and IL-2⁺ T Cell Frequencies Early After Lung Transplantation With Less Chronic Lung Allograft Dysfunction at Two Years. *American Journal of Transplantation*. 2017; 17: 1637–48.
41. Fontaine M., Vogel I., Van Eyck Y.-R., Galuppo A., Ajouaou Y., Decaestecker C., Kassiotis G., Moser M., Leo O. Regulatory T cells constrain the TCR repertoire of antigen-stimulated conventional CD4 T cells. *The EMBO Journal*. 2018; 37: 398–412.
42. Amarnath S., Mangus C.W., Wang J.C., Wei F., He A., Kapoor V., Foley J.E., Massey P.R., Felizardo T.C., Riley J.L., Levine B.L. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Science translational medicine*. 2011; 3 (111): 111ra120. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003130
43. Yu A., Dee M.J., Adeegbe D., Dwyer C.J., Altman N.H., Malek T.R. The lower limit of regulatory CD4⁺ Foxp3⁺ TCRβ repertoire diversity required to control autoimmunity. *The Journal of Immunology*. 2017; 198: 3127–35.
44. Golshayan D., Jiang S., Tsang J., Garin M.I., Mottet C., Lechler R.I. *In vitro*-expanded donor alloantigen-specific CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*. 2007; 109: 827–35.
45. Nishimura E., Sakihama T., Setoguchi R., Tanaka K., Sakaguchi S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by *in vivo* and *in vitro* antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells. *International immunology*. 2004; 16: 1189–201.
46. Sagoo P., Ali N., Garg G., Nestle F.O., Lechler R.I., Lombardi G. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Science translational medicine*. 2011; 3: 83ra42–83ra42.
47. Long E., Wood K.J. Regulatory T cells in transplantation: transferring mouse studies to the clinic. *Transplantation*. 2009; 88: 1050–56.
48. Khaitov R.M., Alekseev L.P., Trofimov D.Yu., Kofiadi I.A., Alekseeva P.L. Immunogenetics and transplantation of hematopoietic stem cells. *Immunologiya*. 2017; (38) 4: 184–92. (in Russian)