

# ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЩЕГО ИММУНИТЕТА КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ИНТРАЛАМЕЛЛЯРНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ БЕСКЛЕТОЧНОГО МОДУЛЯ СТРОМЫ РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА

*Пасечникова Н. В., Насинник И. О., Величко Л. Н.*

*ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМНУ» Одесса, Украина*

**Ключевые слова:** бесклеточный модуль стромы роговицы человека, трансплантация, иммунология

Как известно в мире существует проблема, которая связана с недостатком донорской роговицы [9, 15]. В последнее время ведутся разработки биоинженерных аналогов роговицы и ксеногенной бесклеточной роговичной стромы, способных заменить донорский материал [5, 8, 12].

Несмотря на хорошие результаты, отмечаемые после первичной пересадки роговицы (приживаемость составляет 90% в течение 5 лет и 82% в течение 10 лет), результаты при повторных пересадках ниже примерно в два раза (приживаемость составляет 53% в течение 5 лет и 41% в течение 10 лет) [6, 15]. Кроме того, в 30% случаев применения сквозной кератопластики наблюдается, по крайней мере, один эпизод отторжения трансплантата и около 5–7% случаев болезни трансплантата [13, 14].

Острые и хронические реакции отторжения роговичного трансплантата развиваются в результате первичной или вторичной активации адаптивного (специфического) иммунитета, являются основными причинами неблагоприятного исхода кератопластик и возникают в 25–70% от всех наблюдений в зависимости от этиологии помутнения роговицы [7].

Возникновение реакции отторжения трансплантата роговицы является следствием выраженной активации системы адаптивного иммунитета реципиента, при которой донорская роговица, выступающая в роли антигена, и ее антигенпрезентирующие клетки [11] являются главными индукторами эффекторных иммунных реакций в трансплантате, приводящих к его отторжению [3]. Интенсивность, продолжительность и исход иммунных реакций на трансплантат роговицы определяются степенью антигенных различий между донором и реципиентом, особенностями трансплантата и ложа, в которое осуществляют пересадку [1]. Характер приживания роговичных трансплантатов находится в прямой зависимости от предоперационной активации иммунитета и послеоперационной динамики его показателей – от соотношения пулов

отдельных популяций иммунокомпетентных клеток, наличия сенсibilизированных к антигенам роговицы лимфоцитов в сыворотке крови реципиента [3, 11].

**Цель:** Изучить изменения иммунологического статуса после проведения интраламеллярной имплантации бесклеточного модуля стромы роговицы человека (БМСРЧ) в эксперименте на кроликах.

## Материалы и методы

Участки роговой оболочки, полученные из энуклеированных глаз человека, обрабатывались по предложенной нами методике. Согласно ей они последовательно обрабатывались ионогенными и неионогенными детергентами, а так же глицерилолеатом, что приводило к удалению и вымыванию клеточных и неклеточных элементов роговицы, отщеплению концевых пептидных участков коллагеновых молекул, обуславливающих их антигенные свойства.

Экспериментальное исследование выполнено на 13 кроликах (26 глаз), породы Шиншилла, весом 2,5–3 килограмма. Под общей анестезией на обоих глазах животных производилась интраламеллярная трансплантация БМСРЧ. После вмешательства проводилась стандартная противовоспалительная и антимикробная терапия. Животных осматривали 4 раза в неделю, с последующей фоторегистрацией. Офтальмоскопически оценивалось состояние роговицы и имплантированного БМСРЧ. Срок наблюдения – 2,5 месяца.

Забор крови для иммунологического исследования производился до трансплантации, на 10-е и 28-е сутки после трансплантации. Определялись основные субпопуляции лимфоцитов (Т-клетки, Т-хелперы, Т-супрессоры, естественные киллеры (ЕК), В-клетки), иммунорегуляторный индекс. Также проведено исследование фагоцитарной активности нейтрофилов и степени сенсibilизации лимфоцитов к антигенам роговицы.

## Результаты

При осмотре животных спустя 10 суток после операции признаков воспалительной реакции не наблюдалось, отек роговицы отсутствовал, трансплантаты были прозрачны.

На протяжении 2,5 месяцев после трансплантации у 13 кроликов (26 глаз) глаза были спокойны, признаков воспаления не наблюдалось. Признаков отторжения трансплантатов не отмечалось (рис. 1).

Проведенное исследование изменения содержания основных субпопуляций лимфоцитов в динамике после интраламеллярной имплантации БМСРЧ показало достоверное увеличение абсолютного числа содержания лимфоцитов крови с  $1,07 \pm 0,29$  тыс.кл/мкл до  $2,3 \pm 0,6$  тыс.кл/мкл на 10 день и  $3,2 \pm 0,7$  тыс.кл/мкл на 28 день, Т-клеток с  $685,78 \pm 148,3$  кл/мкл, до  $1677,0 \pm 478,95$  кл/мкл на 10 день и  $2255,3 \pm 443,58$  кл/мкл на 28 день (уровень Т-хелперов с  $496,3 \pm 99,0$  кл/мкл достоверно повысился к 10 дню до  $1233,3 \pm 528,7$  кл/мкл и к 28 дню до  $1927,89 \pm 375,1$  кл/мкл). Количество ЕК с базового уровня  $116,56 \pm 25,17$  кл/мкл достоверно повысилось к 10 дню до  $333,78 \pm 92,1$  кл/мкл и к 28 дню –  $558,56 \pm 207,1$  кл/мкл. Наряду с увеличением содержания основных эффекторных клеток (Т-хелперы, ЕК) отмечено достоверное увеличение абсолютного содержания регуляторных субпопуляций Т – супрессоров с исходного количества  $165,4 \pm 41,85$  кл/мкл до  $253,89 \pm 102,58$  кл/мкл к 10 дню и  $327,3 \pm 94,7$  кл/мкл к 28 дню. Количество фагоцитирующих нейтрофилов к 10 дню увеличилась с  $1327,4 \pm 407,58$  кл/мкл до  $3135,0 \pm 465,3$  кл/мкл и к 28 дню снизилась до уровня  $2916,4 \pm 737,8$  кл/мкл. Степень сенсибилизации к антигенам роговицы увеличилась, при этом индекс напряженности иммунитета достоверно не изменился. Уровни иммунологических показателей крови кроликов после интраламеллярной имплантации БМСРЧ в динамике представлены в таблице 1.

Анализ полученных данных свидетельствует о процессах иммуностимуляции, что характеризуется повышением количества циркулирующих лимфоцитов, принадлежащих к различным субпопуляциям, увеличением соотношения абсолютных значений субпопуляций Т-хелперов/Т-супрессоров, что связано с репаративными про-

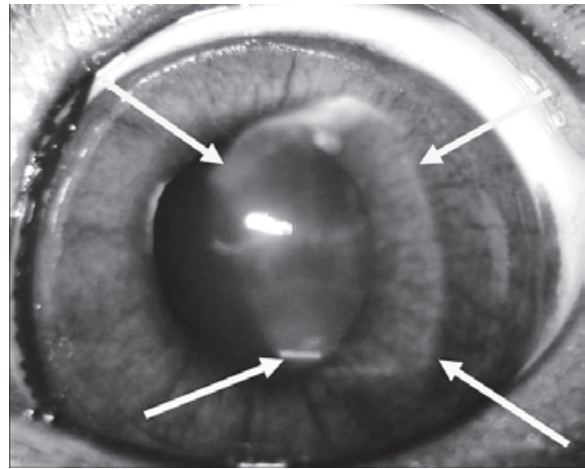


Рис. 1. Фотография глаза кролика через 2,5 месяца после имплантации БМСРЧ. Границы трансплантата отмечены стрелочками

цессами после нанесенной травмы. Определялась сенсибилизация к антигенам роговицы по абсолютным показателям, при этом относительные показатели сенсибилизации практически не изменялись, что свидетельствует о низкой антигенности материала. Иммунологических признаков отторжения трансплантата не наблюдалось, что совпадает с данными литературы [2, 4, 10]

## Заключение

После интраламеллярной имплантации в роговицу кролика бесклеточного модуля стромы роговицы человека, полученного по нашей методике, у 13 кроликов (26 глаз) через 2,5 месяца отсутствовала воспалительная реакция, клинических признаков отторжения трансплантата не наблюдалось. Проведенное исследование изменения иммунологических показателей свидетельствует об иммунном ответе организма экспериментальных животных на трансплантацию БМСРЧ, однако признаков гиперреакции, свидетельствующей об отторжении трансплантата нет. На основании полученных результатов можно предположить о возможности применения бесклеточного модуля стромы роговицы человека в качестве материала для послойной кератопластики, так как он обладает сниженными антигенными свойствами, и не вызывает реакции отторжения.

## Литература

- Bohringer D. Matching of the minor histocompatibility antigen HLA-A1/H-Y may improve prognosis in corneal transplantation / D.Bohringer, E. Spierings, J. Enczmann [et al.] // Transplantation — 2006. — Vol. 27. — P. 1037-1041.
- Bueno V. The role of CD8+ T cells during allograft rejection / V.Bueno, J.O.M. Pestana // Braz. J. Med. Biol. Res. — 2002. Vol.35. — P.1247-1258
- Coster D.J. The impact of corneal allograft rejection on the longterm outcome of corneal transplantation / D.J. Coster, K.A. Williams // Am. J. Ophthalmol.— 2005.— Vol. 140.— P. 1112-1122.
- Cunnusamy K. Paradigm shifts in the role of CD4+ T cells in keratoplasty / K. Cunnusamy, P.W. Chen, J.Y. Niederkorn // Discov Med. - 2010. - Vol. 10. - P. 452-461.

Таблиця 1

**Иммунологические показатели крови кроликов после  
интраламеллярной имплантации БМСРЧ в динамике**

Иммунологические показатели	Базовый уровень $\pm$ SD	10 день $\pm$ SD	28 день $\pm$ SD	P 0–10	P 0–28
Абсолютн. кол-во лейкоцитов, (тыс. кл/мкл)	3,6 $\pm$ 0,9	6,49 $\pm$ 1,24	6,69 $\pm$ 1,27	0,000	0,000
Абсолютн. кол-во лимфоцитов, (тыс. кл/мкл)	1,07 $\pm$ 0,29	2,3 $\pm$ 0,6	3,2 $\pm$ 0,7	0,000	0,000
Относит. кол-во лимфоцитов, (%)	29,78 $\pm$ 3,0	34,89 $\pm$ 4,9	47,67 $\pm$ 6,69	0,024	0,000
Абсолютн. кол-во Т-клеток, (кл/мкл)	685,78 $\pm$ 148,3	1677,0 $\pm$ 478,95	2255,3 $\pm$ 443,58	0,000	0,000
Относит. кол-во Т-клеток, (%)	63,1 $\pm$ 5,4	72,4 $\pm$ 3,7	70,67 $\pm$ 7,2	0,003	0,036
Абсолютн. кол-во Т-хелперы, (кл/мкл)	496,3 $\pm$ 99,0	1233,3 $\pm$ 528,7	1927,89 $\pm$ 375,1	0,005	0,000
Относит. кол-во Т-хелперы, (%)	47,3 $\pm$ 4,0	61,56 $\pm$ 3,7	60,4 $\pm$ 6,0	0,000	0,000
Абсолютн. Кол-во Т-супрессоры, (кл/мкл)	165,4 $\pm$ 41,85	253,89 $\pm$ 102,58	327,3 $\pm$ 94,7	0,047	0,001
Относит. кол-во Т-супрессоры, (%)	15,78 $\pm$ 2,5	10,89 $\pm$ 2,8	10,2 $\pm$ 2,3	0,000	0,001
Имунорегуляторный индекс	3,06 $\pm$ 0,49	6,1 $\pm$ 2,3	6,2 $\pm$ 1,2	0,000	0,000
Абсолютн. кол-во В-клеток, (кл/мкл)	70,89 $\pm$ 13,17	258,1 $\pm$ 110,0	398,56 $\pm$ 182,1	0,000	0,000
Относит. кол-во В-клеток, (%)	7,2 $\pm$ 2,77	11,1 $\pm$ 3,0	12,0 $\pm$ 3,46	0,014	0,009
Абсолютн. кол-во фагоцитирующих кл., (кл/мкл)	1327,4 $\pm$ 407,58	3135,0 $\pm$ 465,3	2916,4 $\pm$ 737,8	0,000	0,000
Относит. кол-во фагоцитирующих кл., (%)	52,2 $\pm$ 5,95	75,56 $\pm$ 6,46	84,2 $\pm$ 3,2	0,000	0,000
Абсолютн. кол-во естественных киллеров, (кл/мкл)	116,56 $\pm$ 25,17	333,78 $\pm$ 92,1	558,56 $\pm$ 207,1	0,000	0,000
Относит. кол-во естественных киллеров, (%)	11,2 $\pm$ 2,2	14,56 $\pm$ 1,9	17,1 $\pm$ 4,48	0,008	0,011
Способность нейтрофилов к розеткообразованию	60,2 $\pm$ 5,14	66,0 $\pm$ 5,66	69,56 $\pm$ 8,1	0,033	0,010
Индекс напряженности иммунитета	1,05 $\pm$ 0,03	1,1 $\pm$ 0,08	1,02 $\pm$ 0,07	0,1	0,018
Абсолютн. показатели сенсибилизация к роговице, (кл/мкл)	3,78 $\pm$ 1,86	13,78 $\pm$ 2,7	18,0 $\pm$ 2,1	0,000	0,000
Относит. показатели сенсибилизация к роговице, (%)	59,3 $\pm$ 5,48	58,67 $\pm$ 4,36	54,89 $\pm$ 7,4	0,647	0,153

**Примечание:** *p* – статистически значимые отличия по критерию Манна-Уитни

5. Hashimoto Y. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressure for corneal tissue engineering / Y. Hashimoto, S. Funamoto, S. Sasaki [et al] // *Biomaterials* – 2010. – Vol. 31. – P.3941–3948
6. Kaminski S.L. Corneal sensitivity 10 years after epikeratoplasty / S.L. Kaminski, R. Biowski, J.R. Lucas [et al] // *J. Refract. Surg.* – 2002. – Vol.18. – P.731-736.
7. Kratchmer J.H. Immunologically High-Risk Penetrating Keratoplasty / J.H. Kratchmer, M.J. Mannis, E.J. Holland [et al.] // *Cornea*.— St. Louis: Mosby, 2005.— 2nd Ed.— Ch. 133.— P. 1619-1635.
8. Liu Y. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation / Y. Liu, L. Gan, D. J. Carlsson [et al] // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 2006. – Vol.47. – P.1869-1875.
9. Moffatt S.L. Centennial review of corneal transplantation / S.L. Moffatt, V.A. Cartwright, T.H. Stumpf // *Clin Exp Ophthalmol* – 2005. – Vol.33. – P.642-657.
10. Niederkorn J.Y. Immune mechanisms of corneal allograft rejection / J.Y. Niederkorn // *Curr Eye Res.* – 2007. - Vol.32. - P.1005-1016.
11. Niederkorn J.Y. Immunology and immunomodulation of corneal transplantation / J.Y. Niederkorn // *Int. Rev. Immunol.*— 2002.— Vol. 21.— P. 173-196.
12. Nishida K. Tissue engineering of the cornea / K. Nishida // *Cornea* – 2003. – Vol.22. – P.28-34.
13. Panda A. Corneal graft rejection / A. Panda, M. Vanathi, A. Kumar [et al] // *Surv Ophthalmol* - 2007. – Vol.52. – P.375-396.
14. Thompson R.W. Jr. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty / Jr. R.W. Thompson, M.O. Price, P.J. [et al] // *Ophthalmology* – 2003. – Vol.110. – P.1396-1402.
15. Whitcher J.P. Corneal blindness: a global perspective / J.P. Whitcher, M. Srinivasan, M.P. Upadhyay // *Bull World Health Organ* – 2001. – Vol.79. – P.214-221.

## THE STUDY OF IMMUNITY OF RABBITS AFTER INTERLAMELLAR TRANSPLANTATION OF ACELLULAR HUMAN CORNEAL STROMA

*Pasychnikova N. V., Nasinnyk I. O., Velichko L. N.*

*State Institution «The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy  
AMS of Ukraine» Odessa, Ukraine*

The diagnostic value of noninvasive laser-scanning methods of investigation: Heidelberg retina tomography. In 13 rabbits (26 eyes) of clinical signs of graft rejection was not observed at 2.5 months after interlamellar transplantation of acellular human corneal. Investigation of the content of the major subpopulations of lymphocytes in the dynamics of post-transplant period (10 and 28 days) showed a significant increase of effector cells: T - helper cells, natural killer cells, and a significant increase in the subpopulation of T-suppressors. The number of phagocytic neutrophils increased on day 10, and the 28 days, declined. The degree of sensitization to antigens of the cornea increased, while the index of the intensity of the immune system has not changed. Such changes in immunological parameters indicate that the immune response of experimental animals to transplantation, but no signs of rejection.

**Keywords:** acellular corneal stroma of human, transplantation, immunology.