

УДК 617.713-08:612.017.1.084

*Е.Н. Свидко, М.В. Останков, Т.Г. Дубрава, Н.А. Бондарович, Ю.А. Демин
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

СОСТОЯНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У КРОЛИКОВ С ИНДУКЦИЕЙ ЛИМБАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ РОГОВИЦЫ И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

Для обоснования применения криоконсервированной кордовой крови человека (кККЧ) при лечении лимбальной недостаточности роговицы (ЛНР) была выбрана экспериментальная модель ожоговой болезни. Было показано, что применение кККЧ восстанавливает показатели Т-клеточного звена иммунитета у кроликов при лечении ЛНР. Лечение ЛНР введением кККЧ имело преимущество – улучшались показатели общих Т-лимфоцитов, субпопуляции регуляторных Т-хелперов и Т-супрессоров/цитотоксических. У животных в наибольшей степени приближались к контролю во все сроки определения показатели иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8). В группе животных, которым применяли разрушенные замораживанием-оттаиванием ККЧ, такого эффекта не наблюдали.

Ключевые слова: лимбальная недостаточность роговицы, криоконсервированная кордовая кровь человека, иммунная система, Т-хелперы, Т-супрессоры, иммунорегуляторный индекс.

Неблагоприятное влияние некроза на течение ожогового процесса связано с возникновением аутоинтоксикации и аутосенсibilизации организма, в результате чего иммунологически толерантные ткани глаза становятся источником антигенной информации, что приводит к развитию аутоиммунных реакций, что обычно сопровождается нарушениями в иммунной системе как на уровне поврежденного органа, так и всего организма [1, 2]. Эти нарушения в свою очередь оказывают влияние на течение посттравматического периода и формирование осложнений [3]. В патогенезе лимбальной недостаточности роговицы (ЛНР) важное значение имеет аутоиммунный компонент. Развитие аутоиммунных реакций сопряжено с ослаблением Т-супрессорного звена и изменением соотношения иммунорегуляторных субпопуляций Т-клеток. Косвенным показателем аутоиммунного процесса может служить повышение иммунорегуляторного индекса (ИРИ) до 2,0 и выше. Главными свидетельствами аутоиммунизации являются клеточный иммунный ответ и антитела, направленные против тканей глаза. Ослабление Т-супрессорного звена, способствующее усилению аутоиммунных реакций, ассоциируется с угрозой развития симпатической

офтальмии [4]. Важно иметь в виду, что органоспецифические реакции могут развиваться не только при «истинно» аутоиммунных формах офтальмопатологии. Эти реакции являются закономерной составной частью иммунного ответа на травму, инфекцию, сосудистые изменения и другие повреждающие факторы при ряде глазных заболеваний не аутоиммунной природы. Выраженное и продолжительное усиление иммунного ответа на антигены измененных тканей свидетельствует о нарушении органоспецифического аутоиммунитета. В таких случаях аутоиммунные реакции могут стать одним из ключевых или доминирующим патогенетическим фактором офтальмопатологии [5]. В некоторых ситуациях для устранения иммунодефицитных состояний необходимо применить иммуностимуляторы. С этой целью используют индукторы интерферона, тактивин, левамизол и т. д. Следует учитывать, что чрезмерная иммуностимуляция или «заместительная» цитокиноterapia также могут вызвать осложнения [6, 7]. Так, вследствие применения препаратов интерферона у больных гепатитами и другими соматическими заболеваниями происходят изменения в структурах глаза (внутриглазные кровоизлияния, ретинопатия и рети-

© Е.Н. Свидко, М.В. Останков, Т.Г. Дубрава и др., 2014

нит, нейропатия, неоваскулярная глаукома и др.). Оптимальным представляется применение иммунокорректоров – средств, позволяющих добиться нормализации исходно нарушенных параметров иммунитета (ослабить гиперреактивность и повысить сниженные показатели, при этом не влияя на нормальные). К ним относятся миелопид, иммунофан; иммунокорректирующий эффект могут дать тактивин, левамизол, полудан, экстракорпоральные методы (плазмаферез, гемосорбция) в комплексе с малыми дозами кортикостероидов [8–10]. В последнее время как в экспериментальной, так и клинической практике в качестве иммунокорректора при различных заболеваниях применяют кордовую кровь [11–14]. Для длительного ее хранения создаются низкотемпературные банки [15, 16].

Целью данной работы была оценка показателей иммунной системы у кроликов с ЛНР и после лечения криоконсервированной кордовой кровью человека (кККЧ).

Материал и методы. Эксперимент выполнен на кролях-самцах породы шиншилла массой 2,0–2,5 кг ($n = 38$; 76 пар глаз) в возрасте шести месяцев в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986), одобренными Национальным конгрессом Украины по биоэтике (Киев, 2007).

Для обоснования применения кККЧ при лечении ЛНР была выбрана экспериментальная модель ЛНР, разработанная Е.С. Милюдиным [17], в нашей модификации. В отличие от метода Милюдина наш метод является более гуманным, так как у кроля не иссекали третье веко, выполняющее защитную функцию и способствующее снижению болевого синдрома у животного, что является важным при проведении экспериментальной работы. Все манипуляции выполняли под местной анестезией роговицы кролика, которую проводили с применением проксиметакаина в 0,5%-ной концентрации (препарат Алкаин, производство фирмы Alcon).

Кордовую кровь человека криоконсервировали в одноразовых пластиковых пробирках по двухэтапной программе на программном замораживателе ОП и СКТБ ИПКиК НАНУ в растворе высокомолекулярного дек-

страна («Полиглокин», «Юрия-Фарм», Украина) по методу [18]. Образцы хранили при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ в низкотемпературном банке ИПКиК НАНУ. В день эксперимента кККЧ отогревали в пробирке на водяной бане при температуре $40\text{--}41\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для формирования модели экспериментальной ЛНР с применением митомицина С из фильтровальной бумаги выкраивали диски диаметром 10 мм и пропитывали их 10%-ным этиловым спиртом. Аппликацию диска на роговицу кролика выполняли в течение 20 секунд. Затем с роговицы микротупфером удаляли поверхностный эпителий. Контролировали удаление эпителия окрашиванием роговицы 1%-ным раствором флюоресцина. После этого выполняли повторную аппликацию диска, пропитанного 0,04%-ным раствором митомицина С в течение 4 минут. Известно, что митомицин С препятствует росту клеток, что приводит к истощению камбиального слоя роговицы. С целью профилактики развития вторичной инфекции на всех глазах проводили местную противомикробную терапию в виде инстилляций 0,25%-ного раствора ципрофлоксацина 4 раза в день в течение 7 дней.

Все животные были разделены на группы: 1-я – индукция ЛНР и введение кККЧ; 2-я – индукция ЛНР; 3-я – индукция ЛНР и введение разрушенных замораживанием клеток кККЧ; 4-я – индукция ЛНР и введение изотонического раствора натрия хлорида; 5 – глаза интактного кроля.

Субпопуляционный состав клеток крови у кроликов определяли методом прямой мембранной иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (США) с использованием ФИТЦ-меченных МАТ (mouse anti rabbit) Santa Cruz Biotechnological (США) к CD3-, CD4-, CD8-молекулам. Анализ результатов проводили на 3-и, 7-е, 14-е сутки в крови кроликов с индукцией ЛНР и после лечения.

Полученные данные статистически обрабатывали параметрическим методом с помощью *t*-критерия Стьюдента или непараметрическим методом Манна–Уитни [19].

Результаты и их обсуждение. Установлено, что уже на 3-и сутки после ожога у животных наблюдались нарушения Т-клеточного иммунитета. У кроликов 2-й группы после индукции ЛНР, так же как и у леченных изотоническим раствором натрия хлорида (4-я группа),

изменение иммунной системы на 3-и сутки характеризовалось стойким снижением количества общих Т-лимфоцитов (CD3⁺). Количество общих Т-лимфоцитов (CD3⁺) незначительно увеличилось на 7-е сутки, но и на 14-е было достоверно ниже контрольных показателей (p<0,05), табл. 1, рис. 1.

(CD8⁺), являясь составным компонентом общей фракции Т-лимфоцитов, изменялись по мере развития ЛНР. Это нашло отражение в резком увеличении иммунорегуляторного индекса, который уже на 3-и сутки достоверно (p<0,05) превышал контрольные значения и был повышенным на 7-е сутки. Иммунорегу-

Таблица 1. Концентрация общих Т-лимфоцитов (CD3⁺) в крови кроликов с индукцией ЛНР (M±m)

Группа животных	Концентрация Т-лимфоцитов, сутки после лечения		
	3-и	7-е	14-е
1-я (ЛНР+кККЧ)	16,8±0,8	16,1±0,8	16,6±0,8
2-я (ЛНР)	6,7±0,3	7,6±0,4	7,2±0,4
3-я (ЛНР+разрушенные кККЧ)	12,5±0,6	14,6±0,7	14,8±0,7
4-я (ЛНР+изотонич. раствор NaCl)	9,6±0,5	11,6±0,6	7,8±0,4
5-я (интактн. контроль)	22,4±1,1		

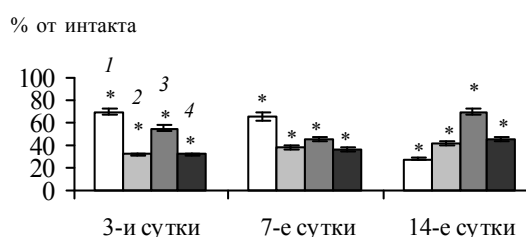
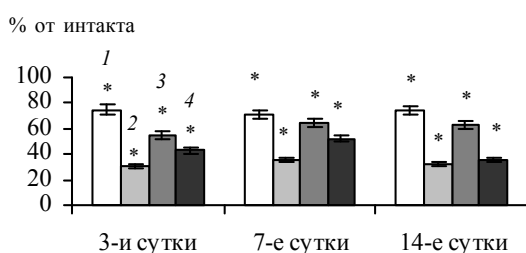


Рис. 1. Процентное содержание общих Т-лимфоцитов (CD3⁺) в крови кроликов с индукцией ЛНР: 1 – ЛНР+кККЧ; 2 – ЛНР; 3 – ЛНР+разрушенные кККЧ; 4 – ЛНР+изотонич. раствор NaCl; p<0,05

Рис. 2. Процентное содержание Т-хелперов (CD4⁺) в крови кроликов с индукцией ЛНР: 1 – ЛНР+кККЧ; 2 – ЛНР; 3 – ЛНР+разрушенные кККЧ; 4 – ЛНР+изотонич. раствор NaCl; p<0,05

В показателях Т-регуляторных клеток была отмечена такая же тенденция. Содержание Т-хелперов (CD4⁺) в крови кроликов с индукцией ЛНР достоверно снижалось в 1-е сутки и незначительно повышалось на 7-е сутки, оставаясь и на 14-е сутки достоверно ниже контроля (p<0,05), рис. 2, табл. 2.

При развитии воспалительного процесса в первые семь суток после ЛНР отмечалось стойкое угнетение Т-супрессоров/цитотоксических (CD8⁺), активации лимфоцитов не наблюдалось и на 14-е сутки (рис. 3, табл. 3).

Субпопуляции регуляторных Т-хелперов (CD4⁺) и Т-супрессоров/цитотоксических

литорный индекс не приходил к норме и на 14-е сутки (рис. 4, табл. 4). Такое отклонение его от контроля свидетельствует о выраженном дисрегуляторном состоянии при ЛНР тех клеток иммунной системы, которые определяют характер реализации иммуновоспалительного процесса.

Таблица 2. Концентрация Т-хелперов (CD4⁺) в крови кроликов с индукцией ЛНР (M±m)

Группа животных	Концентрация Т-хелперов, сутки после лечения		
	3-и	7-е	14-е
1-я (ЛНР+кККЧ)	11,3±1,3	10,4±1,0	12,3±1,3
2-я (ЛНР)	5,2±1,2	6,1±1,1	6,8±0,9
3-я (ЛНР+разрушенные кККЧ)	9,2±2,2	7,2±2,2	11,4±1,4
4-я (ЛНР+изотонич. раствор NaCl)	5,4±0,4	6,0±1,0	7,4±1,2
5-я (интактн. контроль)	16,2±1,7		

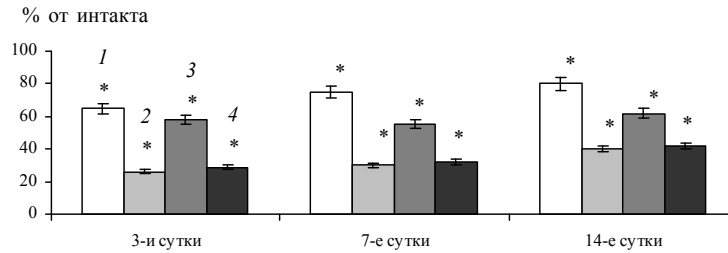


Рис. 3. Процентное содержание Т-супрессоров/цитотоксических ($CD8^+$) в крови кроликов с индукцией ЛНР и после лечения:
1 – ЛНР+кККЧ; 2 – ЛНР; 3 – ЛНР+разрушенные кККЧ;
4 – ЛНР+изотонич. раствор NaCl; $p < 0,05$

тель иммунорегуляторного индекса. В группе животных, которым применяли для лечения разрушенные кККЧ, такого эффекта не наблюдали.

ти возникновения изменений в иммунной системе, характерные для развития ожоговой болезни глаз. Однако состояние индивидуальной иммунореактивности организма животного

Таблица 3. Концентрация Т-супрессоров/цитотоксических ($CD8^+$) в крови кроликов с индукцией ЛНР ($M \pm m$)

Группа животных	Концентрация Т-супрессоров, сутки после лечения		
	3-и	7-е	14-е
1-я (ЛНР+кККЧ)	5,6±0,8	6,5±0,5	6,9±0,9
2-я (ЛНР)	2,15±0,1	2,6±0,2	3,4±0,2
3-я (ЛНР+разрушенные кККЧ)	5,0±0,5	4,6±0,3	5,2±0,2
4-я (ЛНР+изотонич. раствор NaCl)	2,4±0,4	2,8±0,2	3,7±0,7
5-я (интактн. контроль)	8,6±0,8		

Обсуждение результатов. Исследование иммунной системы показало наличие выраженных нарушений у кроликов с индукцией ЛНР. С первых суток у них развивается транзиторная иммунологическая недостаточность, выражающаяся в снижении общего количества Т-лимфоцитов и регуляторных Т-хелперов и Т-супрессоров/цитотоксических клеток, которая сохранялась и до 14-х суток исследования. Таковы общие закономерности

го обуславливает значительные различия течения патологического процесса. Проанализировав результаты исследования Т-клеточного иммунитета и приняв во внимание клинические особенности течения болезни, а также развитие осложнений раннего послеожогового периода, мы выявили определенные коррелятивные связи между степенью угнетения иммунной системы и развитием послеожоговых осложнений. Нормализация иммун-

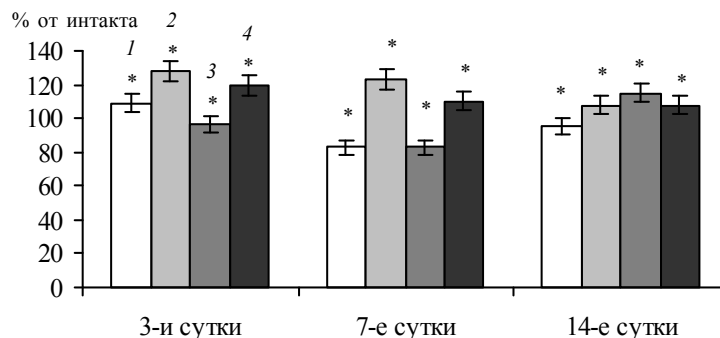


Рис. 4. Показатели иммунорегуляторного индекса ($CD4/CD8$) крови кроликов с индукцией ЛНР до и после лечения:
1 – ЛНР+кККЧ; 2 – ЛНР; 3 – ЛНР+разрушенные кККЧ;
4 – ЛНР+изотонич. раствор NaCl; $p < 0,05$

Таблиця 4. Показатели ИРИ (CD4/CD8) в крови кроликов с индукцией ЛНР до и после лечения

Группа животных	Концентрация Т-супрессоров в сроки, сутки после лечения		
	3-и	7-е	14-е
1-я (ЛНР+кККЧ)	2,02±0,16	1,6±0,5	1,8±0,2
2-я (ЛНР)	2,4±1,1	2,35±1,0	2,0±0,5
3-я (ЛНР+разрушенные кККЧ)	1,8±0,4	1,56±1,2	2,2±0,7
4-я (ЛНР+изотонич. раствор NaCl)	2,25±1,0	2,1±0,5	2,0±0,2
5-я (интактн. контроль)	1,9±0,2		

ных показателей коррелировала с динамикой течения ожоговой болезни, развитием рубцевания пораженных тканей переднего отдела глазного яблока той или иной степени интенсивности, возникновением послеожоговых симблефаронов, помутнением оптических сред глаза. При ожогах у кроликов с ЛНР (2-я группа) или которых лечили изотоническим раствором NaCl (4-я группа), отмечалось более выраженное снижение показателей Т-клеточного иммунитета. Показатели не пришли к норме и на 14-е сутки после ожога, даже позже нормализации клинического состояния. У животных с индукцией ЛНР уже в 1-е сутки после ожога возникает выраженная иммуносупрессия, которая приводит к более тяжелому течению ожогового процесса и проявляется типичными признаками вторичного иммунодефицита: нарастающей лимфоцитопенией, снижением количества Т-лимфоцитов, которые достигали наибольшего развития на 3-и сутки ожогового процесса. В этот период наблюдался

«всплеск» воспалительной реакции, возникали различные осложнения (эрозии и язвы роговицы), отмечалось выраженное снижение митотической активности переднего эпителия роговицы. Применение кККЧ у животных 1-й группы нормализовало эти показатели, способствовало улучшению течения ожогового процесса и влияло на его исход.

Выводы

В основе механизма действия кККЧ, по-видимому, лежит его высокая иммуотропная активность, которая обеспечивает уменьшение проявлений реакции тканей глаза на Т-антиген. Проведенные иммунологические исследования позволили рекомендовать для лечения ожогов глаз в качестве иммуномодулятора кККЧ. Благодаря наличию комплекса биологически активных веществ и клеточных элементов, кККЧ способствует коррекции измененных показателей Т-клеточного звена иммунной системы, которые развиваются при ожоговом процессе как в глазу, так и в организме в целом.

Литература

1. Чаланова Р.И. Клинико-иммунологические особенности стресс-реактивности организма в динамике клинического течения ожоговой болезни глаз / Р.И. Чаланова, Т.В. Дегтяренко // Вестник офтальмологии. – 2014. – Вып. 130 (1). – С. 42–45.
2. Application of adipose-derived stem cells on scleral contact lens carrier in an animal model of severe acute alkaline burn / L. Espandar, D. Caldwell, R. Watson [et al.] // Eye Contact Lens. – 2014 Jun 4. – Vol. 40. – № 4. – P. 243–247.
3. Alkali burn versus suture-induced corneal neovascularization in C57BL/6 mice: an overview of two common animal models of corneal neovascularization / C. Giacomini, G. Ferrari, F. Bignami, P. Rama // Exp. Eye Res. – 2014 Apr. – P. 121–124.
4. Zhao M. Immunohistochemistry studies on the thermal burn of cornea in rats / M. Zhao, J. Chen, P. Yang // Yan Ke Xue Bao. – 1997 Jun. – Vol. 13 (2). – P. 70–74.
5. Pflugfelder S.C. Symposium Participants. Immunoregulation on the ocular surface: 2nd Cullen Symposium / S.C. Pflugfelder, M.E. Stern // Ocul Surf. – 2009 Apr. – Vol. 7 (2). – P. 67–77.
6. Варданян И.Р. Клинико-иммунологические характеристики и лечение больных с ожогами глаз и послеожоговыми бельмами роговицы: автореф. дис. ... канд. мед. наук / И.Р. Варданян. – М., 2000. – 18 с.
7. Захарова И.А. Клиническая оценка эффективности альфа-интерферона в купировании посттравматического воспалительного процесса в роговице / И.А. Захарова, В.Ю. Махмутов // Актуальные вопросы воспалительного заболевания глаз: матер. научн.-практ. конф. – М., 2001. – С. 315–317.

8. Хаитов Р.М. Основные принципы иммуномодулирующей терапии / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2000. – № 1. – С. 6–9.
9. Маркова Т.П. Растительный иммуностимулирующий препарат – Иммунал. Перспективы применения в медицине / Т.П. Маркова // РМЖ. – 2002. – Т. 10, № 28. – С. 1330–1331.
10. Царев С.В. Эффективность иммунала как неспецифического иммуностимулятора / С.В. Царев // РМЖ. – 2003. – Т. 11, № 16. – С. 950.
11. Levels of cytokines in umbilical cord blood in relation to spontaneous term labor / E. Tutdibi, A. Hunecke, U. Lindner [et al.] / J. Perinat Med. – 2012. – Vol. 40. – P. 527–532.
12. Application of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of neurotrophic keratitis / K.C. Yoon, I.C. You, S.K. Im [et al.] / Ophthalmology. – 2007. – Vol. 114. – P. 1637–1642.
13. Evaluation of umbilical cord serum therapy in acute ocular chemical burns / N. Sharma, M. Goel, T. Velpandian [et al.] / Invest Ophthalmol. Vis. Sci. – 2011. – Vol. 52. – P. 1087–1092.
14. Application of umbilical cord serum eyedrops for recurrent corneal erosions / K.C. Yoon, W. Choi, I.C. You, J. Choi / Cornea. – 2011. – Vol. 30. – P. 744–748.
15. The impact of intrapartum factors on umbilical cord blood stem cell banking / U. Aufderhaar, W. Holzgreve, E. Danzer [et al.] / J. Perinat Med. – 2003. – Vol. 31. – P. 317–322.
16. Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units / F. Mancinelli, A. Tamburini, A. Soagnoli [et al.] / Transplant. Proc. – 2006. – Vol. 38. – P. 1174–1176.
17. Миллюдин Е.С. Экспериментальная модель недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия / Е.С. Миллюдин / Вестник СамГУ. – Естественно-научная серия. – 2006. – № 9 (49). – С. 219–226.
18. Влияние криоконсервирования по двухэтапной программе в растворе высокомолекулярного декстрана на цитоморфологические и функциональные свойства клеток кордовой крови человека / О.Ю. Кожина, М.В. Останков, И.Г. Гриша, Н.А. Бондарович // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, № 1. – С. 58–65.
19. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л. : Медгиз, 1962. – С. 180.

К.М. Свідко, М.В. Останков, Т.Г. Дубрава, М.А. Бондарович, Ю.А. Дьомін
СТАН Т-КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ У КРОЛІВ З ІНДУКЦІЄЮ ЛІМБАЛЬНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ РОГІВКИ ТА ПІСЛЯ ЛІКУВАННЯ

Для обґрунтування застосування криоконсервованої кордової крові людини (кККЛ) при лікуванні лімбальної недостатності рогівки (ЛНР) була обрана експериментальна модель опікової хвороби. Було показано, що застосування кККЛ більшою мірою відновлює показники Т-клітинної ланки імунітету у кролів при лікуванні ЛНР. Лікування ЛНР введенням кККЛ мало перевагу – поліпшувалися показники загальних Т-лімфоцитів, субпопуляції регуляторних Т-хелперів і Т-супресорів/цитотоксичних. У піддослідних кролів найбільшою мірою наближались до контролю в усі терміни визначення показники імунорегуляторного індексу (CD4/CD8). У групі тварин, у якій застосовували зруйновані заморожуванням-розморожуванням ККЛ, такого ефекту не спостерігали.

Ключові слова: лімбальна недостатність рогівки, криоконсервована кордова кров людини, імунна система, Т-хелпери, Т-супресори, імунорегуляторний індекс.

K.N. Svidko, M.V. Ostankov, T.G. Dubrava, N.A. Bondarovich, Yu.A. Dyomin
T-CELL IMMUNITY STATUS IN RABBITS WITH LIMBAL STEM CELLS DEFICIENCY IN EXPERIMENT AND AFTER TREATMENT

In this experimental study for investigation of the effect application of human cryopreserved cord blood cells (CCBC) in the treatment of limbal stem cells deficiency (LCD) was chosen as an experimental model of burn disease. It has been shown that the use of CCBC has a greater extent, restores the performance of T-cell immunity in rabbits during treatment of LCD. Treatment of LCD by using CCBC had the advantage in terms of improved performance of general T-lymphocyte subpopulation of regulatory T-helper and T-suppressor cells. These animals had approximates to the control indicators IRI (CD4/CD8) at all time determining. In the group of animals with using of inactivated CCBC such effect was not observed.

Key words: limbal insufficiency of cornea, cryo preserved cord blood of man, immune system, T-helpers, T-suppressor cells, immunoregulatory index.

Поступила 16.06.14