

## СТАН КЛІТИННОЇ ТА ГУМОРАЛЬНОЇ ЛАНОК ІМУННОЇ СИСТЕМИ КРОЛІВ З МЕХАНІЧНОЮ НЕПРОНИКАЮЧОЮ ТРАВМОЮ РОГІВКИ ТА ЗА ЇЇ КОРЕКЦІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ СТРОМИ КСЕНОРОГІВКИ, ОТРИМАНОЇ МЕТОДОМ ДЕЦЕЛЮЛЯРИЗАЦІЇ

©С. М. Шмир, І. М. Кліщ

*Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України*

**РЕЗЮМЕ.** У роботах ряду науковців вказується на важливу роль імунної системи у патогенезі запального процесу травмованого ока, зокрема доведено, що виникнення і динаміка реакцій клітинного імунітету тісно пов'язані з характером перебігу захворювання.

**Мета дослідження** – вивчити динаміку показників гуморального та клітинного імунітету в крові кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки та за її корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації.

**Матеріал і методи.** Ушкодження рогівки відтворювали на кролях породи шиншила. На обох очах під місцевою епібульбарною анестезією 0,5 % розчином алкаїну та ретробульбарною анестезією 2 % розчином лідокаїну трепаном у верхній половині рогівки наносили концентричну епітеліальну насічку, в межах якої одноразовим офтальмологічним скальпелем видаляли епітелій разом з переднім шаром строми рогівки. Трансплантаційний матеріал – строма ксенорогівки свині, отримана методом децелюляризації, яку проводили шляхом її обробки 0,5 % розчином додецилсульфату натрію та, в подальшому, ультразвуком з подальшою інкубацією за наявності 0,1 % розчину папаїну. Концентрацію фактора імуноглобулінів у крові тварин визначали імуноферментним методом, стан клітинного імунітету оцінювали за вмістом CD4+, CD8+. Проби аналізували на проточному цитофлуориметрі.

**Результати.** Результати проведеного дослідження вказують на відмінності динаміки рівня факторів імунного захисту у крові кролів, яким моделювали механічну непроникну травму рогівки, і тих тварин, яким проводили хірургічну корекцію. Зокрема, моделювання механічної травми рогівки призводить до активування факторів гуморального імунітету у ранній посттравматичний період з подальшою нормалізацією до 28-ї доби та виразного порушення клітинного імунітету у вигляді дисбалансу субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з переважним зростанням Т-хелперів і прогресивним збільшенням імунорегуляторного індексу.

Проведення хірургічної корекції з використанням еквівалента строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації, на початкових етапах патологічного процесу спричиняє більш виразні порушення з боку імунної системи, спричинені, з одного боку, травмою рогівки, а з іншого – наявністю стороннього субстрату, хоча й із меншим ступенем імуногенності, ніж при використанні свіжої чи криоконсервованої рогівки. Однак, вже через 14 днів спостерігається нормалізація імунної відповіді, що свідчить про нормальне приживлення ксенотрансплантата.

**Висновок.** Нанесення механічної травми рогівки супроводжується активізацією факторів гуморальної та клітинної ланок імунної відповіді, особливо на початковому етапі патологічного процесу. Проведення хірургічної корекції з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, зумовлює ще більшу активацію неспецифічної резистентності організму у перші 7 діб експерименту з подальшою їх нормалізацією до 28-ї доби.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** травма рогівки; корекція; ксеімплантат; імунна система; клітинний імунітет; гуморальний імунітет.

**Вступ.** Серед причин, що призводять до порушення чи навіть повної втрати зору травми ока посідають чільне місце, поступаючись лише катаракті [1, 2]. Аналіз світової літератури, проведений Negrel & Thylefors, виявив глобальну епідемію очної травми з приблизно 55 мільйонами випадків травм очей, які відбуваються щорічно, з яких 750 000 випадків вимагали госпіталізації [3]. Крім того, вони підраховали, що у світі на сьогодні є більше 1,6 мільйона сліпих людей через отримані травми, 2,3 мільйона мають двосторонній слабкий зір, а 19 мільйонів мають односторонню сліпоту або слабкий зір. Незважаючи на те, що очна травма є глобальною проблемою, тягар сліпоти внаслідок травм ока найбільше лягає на країни, що розвиваються, особливо ті, де ведуться воєнні

дії, значна кількість травм у яких спричинена мінами [2, 3]. В Україні серед причин первинної інвалідності внаслідок патології органа зору наслідки травм ока посідають чільне місце і складають 25,5 % [4]. У цій статистиці не враховані випадки травм очей, спричинені російською агресією, які є значними.

У роботах ряду науковців вказується на важливу роль імунної системи у патогенезі запального процесу травмованого ока, зокрема доведено, що виникнення і динаміка реакцій клітинного імунітету тісно пов'язані з характером перебігу захворювання [5, 6]. Імунна привілейованість органа зору і його стійкість до шкідливої дії різних чинників визначається особливостями його місцевої організації і системних механізмів відповіді на антиген [7].

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення

Одним із перспективних методів, що може бути використаний для закриття дефектів при травмах і виразках рогівки, є ксенотрансплантація [8]. Дослідники, що працюють у галузі експериментальної та клінічної офтальмології, вказують на ефективність методики ксенотрансплантації з використанням рогівки свині, зважаючи на генетичну спорідненість, а також так звану «імунову привілейованість ока», що зменшує ймовірність відторгнення. Однак пересадка цілісної рогівки має ризик відторгнення, враховуючи, що як  $\alpha$ Gal, так і не- $\alpha$ Gal (наприклад, N-гліколілнейрамінова кислота) експресуються в клітинах рогівки свиней [9–11]. Звідси випливає необхідність пошуку методів зменшення імуногенного навантаження та ймовірності відторгнення ксенотрансплантата. Оскільки клітинні компоненти рогівки свиней є основним джерелом ксеноантигенів [12], децелюляризована рогівка має перевагу у зниженні імунної відповіді після трансплантації [13].

**Метою** нашої роботи є дослідження динаміки показників гуморального та клітинного імунітету в крові кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки та за її корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації.

**Матеріал і методи дослідження.** Пошкодження рогівки відтворювали на кролях виду Шиншила із дотриманням правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів та з іншою науковою метою [13], а також згідно з Науково-практичними рекомендаціями з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [14]. Кролі отримували повноцінне збалансоване харчування і перебували в належних санітарно-гігієнічних умовах віварію Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.

На обох очах під місцевою епібульбарною анестезією 0,5 % розчином алкаїну та ретробульбарною анестезією 2 % розчином лідокаїну трепаном у верхній половині рогівки наносили концентричну епітеліальну насічку, в межах якої одноразовим офтальмологічним скальпелем видаляли епітелій разом з переднім шаром строми рогівки (рис. 1).

Трансплантаційний матеріал – строма ксенорогівки свині, отримана методом децелюляризації, яку проводили шляхом її обробки 0,5 % розчином додецилсульфату натрію та, у подальшому, ультразвуком з наступною інкубацією за присутності 0,1 % розчину папаїну.

Корекцію травми здійснювали закриттям дефекту рогівки з використанням еквівалента строми рогівки, отриманої методом децелюляризації (рис. 2), пришиванням її в 4 місцях (на 3, 6, 9 та

12 години) до склери через кон'юнктиву за допомогою атравматичної голки 8/0 нейлон. Впродовж восьми діб після операції тваринам проводилась інстиляція розчину антибіотика фторхінолонового ряду – Вігамокс (1 крапля 3 рази на день).

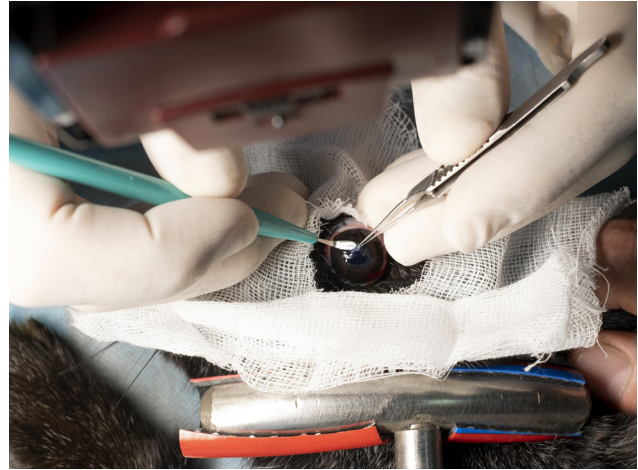


Рис. 1. Моделювання механічної непроникаючої травми рогівки.



Рис. 2. Закривання дефекту рогівки з використанням строми, отриманої методом децелюляризації.

Забір крові у різні терміни спостереження проводили з вушної вени зовнішнього краю вуха кролів.

Концентрацію імуноглобулінів класів A (IgA), M (IgM), G (IgG) визначали за допомогою імуноферментного методу на аналізаторі Multiskan FC 357 з використанням наборів реагентів «GeneTex» (США) згідно з інструкціями фірми-виробника.

Стан клітинного імунітету оцінювали за вмістом CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> і імунорегуляторного індексу (IPI) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Проби аналізували на проточному цитофлуориметрі BD Accuri C6 [15].

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Excel (Microsoft, США) та STATISTICA 7.0 (Statsoft,

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення США) з використанням непараметричних методів оцінки одержаних даних. Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою критерію Манна – Уїтні. Зміни вважали статистично достовірними при  $p < 0,05$ .

**Результати й обговорення.** Аналіз динаміки концентрації основних класів імуноглобулінів сироватки крові у посттравматичному періоді після моделювання непроникаючої механічної травми рогівки дозволив установити суттєві зміни у всі терміни спостереження (табл. 1). Уже на 3-ю добу спостереження ми зафіксували статистично значиме підвищення рівнів IgA у 1,6 раза, IgM – у 2,1 раза, IgG – у 1,3 раза стосовно контролю. У подальші терміни спостереження ми зафіксували менш виразне зростання концентрації імуноглобулінів IgA та

IgM та більш інтенсивне зростання концентрації IgG. Зокрема, на 7-му добу після змодельованої травми концентрація IgA перевищувала показник тварин без змодельованої патології у 1,4 раза, IgM – у 1,9 раза. У подальшому ці показники знижувались ще більше і до 28-мої доби достовірно не відрізнялись від аналогічних показників тварин без змодельованої патології. Концентрація IgG на 7-му добу суттєво зростала і склала 186,51 % від норми, а на 14-ту добу – 244,9 від рівня тварин без змодельованої патології. До 28-ї доби показник зменшувався, однак усе ж на 93,1 % перевищував рівень норми. Зростання концентрації основних класів імуноглобулінів свідчить про активізацію гуморального та місцевого імунітету, спричинену змодельованою травмою рогівки. Збільшення кількості впродовж перебігу травматичного періоду Ig G указує на виразну активацію імунних реакцій в організмі в процесі захворювання [11].

Таблиця 1. Показники гуморальної ланки імунного захисту у сироватці крові кролів з механічною травмою рогівки та корекцією з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації (M±m)

Група тварин		Показник		
		Ig A, пг/мл	Ig M, пг/мл	Ig G, пг/мл
Без змодельованої патології (n=10)		1,12±0,04	2,27±0,06	2,96±0,05
Механічна травма рогівки	3-тя доба, (n=10)	1,84±0,07*	4,62±0,11*	3,85±0,06*
	7-ма доба, (n=10)	1,56±0,08*	4,48±0,09*	5,51±0,07*
	14-та доба, (n=10)	1,35±0,05	3,57±0,08*	7,25±0,11*
	28-ма доба, n=10)	1,23±0,06	2,34±0,09*	5,72±0,09*
Механічна травма рогівки+ хірургічна корекція	3-тя доба, (n=10)	3,22±0,09**	5,70±0,12**	8,35±0,11**
	7-ма доба, (n=10)	2,88±0,07**	2,98±0,07**	9,79±0,12**
	14-та доба, (n=10)	1,53±0,05**	2,57±0,05**	7,26±0,10*
	28-ма доба, n=10)	1,12±0,03*	2,26±0,04	4,67±0,09**

Примітки: \* – відмінності достовірні між групою тварин без моделювання патологічного процесу і тварин, яким моделювали механічну травму рогівки ( $p < 0,05$ ); # – відмінності достовірні між дослідними групами тварин без хірургічної корекції і з хірургічною корекцією у відповідні терміни спостереження ( $p < 0,05$ ).

Хірургічна корекція експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки з використанням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, супроводжувалася дещо іншою динамікою вмісту сироваткових імуноглобулінів. Вона зумовлювала активацію неспецифічної резистентності організму вже через 3 доби, яка проявлялась достовірно вищою концентрацією імуноглобулінів основних класів проти даних 3-ої доби у тварин без корекції. Зокрема, рівень IgA перевищував у 2,9 раза показник тварин без змодельованої патології і був на 75,1 % вищим, ніж у тварин без корекції, IgM перевищував показник норми у 2,5 раза, а IgG – у 2,8 раза, що було також вищим від показників тварин із механічною травмою без корекції відповідно на 12,3 та 116,0 %. У подальші терміни спостереження рівень факторів гуморального імунітету зазнавав неоднотипних

змін. Так, починаючи з 7-ої доби рівні IgA та IgM суттєво знижувались і до 28-ої доби не перевищували норми. Концентрація IgG на 7-му добу й надалі зростала і склала 330,7 % стосовно тварин без патології і була на 77,7 % вищою, ніж у тварин без корекції. У подальшому показник IgG у цій групі також знижувався, однак і на 28-му добу на 57,8 % перевищував рівень групи тварин без патології, але був на 22,5 % нижчим, ніж у тварин з травмою рогівки без корекції ( $p < 0,05$ ).

Результати дослідження основних показників клітинного імунітету у крові кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки представлені у таблиці 2. Рівень Т-хелперів на 3-тю добу експерименту зріс на 46,4 %, що достовірно вище, ніж у тварин без патології. На 7-му добу спостереження цей показник залишався майже на тому ж рівні (зростання на 41,1 % ( $p < 0,05$ )). З 14-ої доби рівень

Таблиця 2. Динаміка показників клітинної ланки імунного захисту у сироватці крові кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки (M±m)

Група тварин		Показник		
		CD4+, %	CD8+, %	CD4+/CD8+
Без змодельованої патології (n=10)		22,16±0,46	12,57±0,19	1,62±0,08
Механічна травма рогівки	3-тя доба, (n=10)	32,44±0,63*	16,55±0,26*	1,96±0,08*
	7-ма доба, (n=10)	31,25±0,48*	17,07±0,21*	1,83±0,08*
	14-та доба, (n=10)	28,77±0,44*	16,53±0,25*	1,74±0,06*
	28-ма доба, n=10)	26,93±0,46*	16,02±0,22*	1,68±0,07
Механічна травма рогівки+ хірургічна корекція	3-тя доба, (n=10)	39,82±0,76**	15,06±0,34*	2,64±0,09**
	7-ма доба, (n=10)	38,33±0,58**	15,17±0,41*	2,53±0,07**
	14-та доба, (n=10)	30,47±0,52**	16,74±0,25*	1,82±0,06**
	28-ма доба, n=10)	24,93±0,42	15,11±0,26*	1,65±0,05

Примітки: \* – відмінності достовірні між групою тварин без моделювання патологічного процесу і тварин, яким моделювали механічну травму рогівки (p<0,05); # – відмінності достовірні між дослідними групами тварин без хірургічної корекції і з хірургічною корекцією у відповідні терміни спостереження (p<0,05).

T-хелперів почав знижуватись, однак залишався на 29,8 % вищим за показник тварин без патології (p<0,05). На 28-му добу спостереження досліджуваний показник залишався достовірно вищим від рівня норми на 21,5 %.

Динаміка змін T-супресорів – клітин, що пригнічують активацію клітинного і гуморального імунітету, впливаючи на механізми міжклітинної взаємодії, а також регулюють якісний склад популяцій лімфоцитів [11], була аналогічною за спрямованістю, проте менш виразною. Так, досліджуваний показник на 3-тю добу спостереження достовірно зріс на 31,7 %, на 7-му добу – на 35,8 %, 14-ту – 35,1 % відносно тварин без змодельованої патології (p<0,05)). На 28-му добу спостереження рівень T-супресорів знижувався ще більше і склав 127,5 % від норми (p<0,05).

Імунорегуляторний індекс на 3-тю добу експерименту достовірно зріс на 21,0 %. У подальші терміни спостереження показник знижувався, порівняно з 3-ю добою, і до завершення терміну експерименту достовірно не відрізнявся від норми.

Проведення хірургічної корекції супроводжувалось більш виразними змінами досліджуваних показників на початкових етапах експерименту. Зокрема, на 3-тю добу від моменту проведення хірургічної корекції рівень T-хелперів зріс на 79,9 % стосовно тварин без змодельованої патології, що також склало 122,7 % відносно тварин без проведеної корекції. На 7-му добу показник суттєво не змінився, а з 14-ої доби почалось його зниження: на 14-ту добу він на 37,5 % перевищував показник норми, а на 28-му – на 12,5 %, що було навіть на 8,1 % менше, ніж у тварин без корекції. Стосовно T-супресорів ми зафіксували значно менш виразні зміни, ніж у випадку з T-хелперами. На 3-тю добу зафіксовано зростання рівня T-супресорів на 19,8 % стосовно тварин без патології, що було на

9,1 % менше, ніж у тварин без корекції. До 7-мої доби суттєвих змін не відбулося, а на 14-ту добу рівень T-супресорів зріс більш суттєво – на 33,2 %. До 28-ї доби показник знизився і склав 120,2 % від норми і суттєво не відрізнявся від аналогічного показника тварин без корекції.

Більш значні зміни ми отримали при розрахунку імунорегуляторного індексу. На 3-тю добу він зріс на 62,9 % від рівня тварин без патології, що на 34,7 % більше, ніж у тварин без корекції. На 7-му добу відбулось незначне зниження IPI, порівняно з попереднім терміном спостереження, однак він на 38,2 % перевищував показник тварин без корекції. Більш суттєве зниження IPI відбулось на 14-ту добу, коли він склав 112,3 % від норми, а до 28-ої доби показник досяг рівня тварин без змодельованої патології. У ці терміни достовірної різниці з показниками тварин без корекції не було.

Незважаючи на те, що при ушкодженнях переднього відділу очного яблука об'єм ушкодження відносно малий, для цього виду ураження характерні такі особливості: зміни в імунній системі, властиві механічній травмі загалом, незалежно від її локалізації; специфічні зміни, пов'язані з анатомо-фізіологічними особливостями органа зору, зокрема з імунною привілейованістю органа зору; порушення з боку клітинної ланки імунної системи з активацією поглинальних функцій та супресією мікробіоцидного потенціалу фагоцитуючих клітин. Пошкодження переднього відділу очного яблука супроводжуються порушеннями в імунній системі як на рівні самого пошкодженого органа, так і системного імунітету у відповідь на травму та перенесений стрес [7]. Ці порушення, в свою чергу, впливають на перебіг травматичного періоду і формування ускладнень.

За даними Н. Я. Козарійчук, корнеосклеральні пошкодження викликають поєднані, місцеві та

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення системні дисфункції в імунній системі: гіперпродукцію прозапальних цитокінів, порушення фагоцитозу, зрушення в рівнях Т- і В-лімфоцитів, аутоімунні реакції [17].

Проведення хірургічної корекції з використанням еквівалента строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації, на початкових етапах патологічного процесу призводить до більш виразних порушень з боку імунної системи, спричинених, з одного боку, травмою рогівки, а з іншого – наявністю стороннього субстрату, хоча і з меншим ступенем імуногенності, ніж при використанні свіжої чи кріоконсервованої рогівки. Однак, вже через 14 днів спостерігається нормалізація імунної відповіді, що свідчить про нормальне приживлення ксенотрансплантата.

**Висновки.** Моделювання механічної травми рогівки призводить до активування факторів гуморального імунітету в ранній посттравматичний період у крові кролів з подальшою нормалізацією до 28-ої доби та виразне порушення клітинного імунітету у вигляді дисбалансу субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з переважним зростанням Т-хелперів і прогресивним збільшенням імунорегуляторного індексу.

Проведення хірургічної корекції травми рогівки з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, зумовлює активацію неспецифічної резистентності організму у перші 7 діб експерименту, яка проявляється достовірно вищою концентрацією IgA, IgM, IgG та факторів клітинного імунітету з подальшою їх нормалізацією до 28-ї доби.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Deanna H. D. Treatment of Non-Infectious Corneal Injury: Review of Diagnostic Agents, Therapeutic Medications, and Future Targets / H. D. Deanna, M. R. Kamran, K. Dimitrios // *Drugs*. – 2022. – Vol. 82. – P. 145–167.
2. Недзвецькая О. В. Неотложная помощь при ранениях и контузиях органа зрения и его придаточного аппарата / О. В. Недзвецькая // *Медицина неотложных состояний*. – 2015. – № 4 (67). – С. 9–21.
3. Negrel A. D. The global impact of eye injuries / A. D. Negrel, B. Thylefors // *Ophthalmic Epidemiology*. – 1998. – Vol. 5. – P. 143–167.
4. Чуднявцева Н. А. Имплантация мягкой заднекамерной ИОЛ при нарушении капсульной поддержки у больных с травматическим повреждением хрусталика и стекловидного тела / Н. А. Чуднявцева, Ю. Н. Родина // *Офтальмологический журнал*. – 2012. – № 6. – С. 124–127.
5. Иммунологическая характеристика пациентов с различной патологией роговицы при проведении послойной кератопластики с применением биоматериала «аллоплант» / Р. З. Кадыров, Е. М. Гареев, В. Г. Яковлева [и др.] // *Медицинская иммунология*. – 2012. – Т. 14, № 6. – С. 513–518.
6. Турчин Н. В. Динамика показателей клеточно-иммунитета крови и водянистой влаги при экспериментальной механической непроникающей травме роговицы / Н. В. Турчин // *Офтальмология. Восточная Европа*. – 2015. – № 4 (27). – С. 35–41.
7. Сравнительная оценка иммунологической реактивности при сочетанной травме глаза / Э. М. Касимов, И. А. Заргарли, И. К. Намазова, С. Р. Меджидова // *Офтальмология*. – 2011. – № 3 (7). – С. 50–55.
8. Yoon C. H. Corneal xenotransplantation: Where are we standing? / C. H. Yoon, H. J. Choi, M. K. Kim // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2021. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100876. Epub 2020 Aug 2. PMID: 32755676; PMCID: PMC7396149.
9. Distribution of non-gal antigens in pig cornea: relevance to corneal xenotransplantation / D. Cohen, Y. Miyagawa, R. Mehra [et al.] // *Cornea*. – 2014. – Vol. 33. – P. 390–397.
10. Gal alpha(1-3)Gal expression of the cornea in vitro, in vivo and in xenotransplantation / H. I. Lee, M. K. Kim, J. Y. Oh [et al.] // *Xenotransplantation*. – 2007. – Vol. 14. – P. 612–618.
11. Miyagawa S. Xenotransplantation – New Insights / S. Miyagawa. – London : IntechOpen, 2017.
12. The attitude toward xenocorneal transplantation in wait-listed subjects for corneal transplantation in Korea / J. J. Lee, D. H. Kim, Y. E. Jang [et al.] // *Xenotransplantation*. – 2014. – Vol. 21. – P. 25–34.
13. Are corneal cells susceptible to antibody-mediated killing in corneal allograft rejection? / S. L. Hargrave, E. Mayhew, S. Hegde, J. Niederhorn // *Transpl. Immunol.* – 2003. – Vol. 11. – P. 79–89.
14. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg: Council of Europe, 1986. – No. 123. – 52 p.
15. Кожемякін Ю. М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожемякін. – К., 2002. – 155 с.
16. Bunders M. Age-related standards for total lymphocyte, CD4+ and CD8+ T cell counts in children born in Europe / M. Bunders, M. Cortina-Borja, M. L. Newell // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2005. – Vol. 24, No. 7. – P. 595–600.
17. Козарийчук Н. Я. Современные данные о механизмах иммунной дисфункции при повреждении переднего отдела глазного яблока (обзор литературы) / Н. Я. Козарийчук // *Клінічна та експериментальна патологія*. – 2016. – Т. XV, № 2 (56), ч. 1. – С. 210–214.

REFERENCES

1. Deanna, H.D. Kamran, M.R. & Dimitrios, K. (2022). Treatment of noninfectious corneal damage: a review of diagnostic tools, therapeutic agents and future targeted agents. *Drugs*, 82, 145-167.
2. Nedzvetskaya, O.V. (2015). Neotlozhnaya pomoshch pri raneniyakh i kontuziyakh organa zreniya i yego pridatochnogo apparata [Emergency care for injuries and contusions of the organ of vision and its appendages]. *Meditsina neotlozhnykh sostoyaniy – Emergency Medicine*, 4(67), 9-21 [in Russian].
3. Nehrel, A.D., & Tilefors, B. (1998). Global impact of eye injuries. *Ophthalmological epidemiology*, 5, 143-167.
4. Chudnyavtseva, N.A., & Rodyna, Yu.N. (2012). Implantatsiya myagkoy zadnekamernoy IOL pri narushenii kapsulnoy podderzhki u bolnykh s travmaticheskim povrezhdeniyem khrustalika i steklovidnogo tela [Implantation of a soft posterior chamber IOL in case of violation of capsular support in patients with traumatic damage of the lens and vitreous body]. *Oftalmologicheskij zhurnal – Ophthalmological Journal*, 6, 124-127 [in Russian].
5. Kadyrov, R.Z., Hareev, E.M., Yakovleva, V.H., Kurchatova, N.N., Yusupova, R.Sh., & Prymov, R.E. (2012). Immunologicheskaya kharakteristika patsiyentov s razlichnoy patologiyey rogovitsy pri provedenii posloynnoy keratoplastiki s primeneniym biomateriala «alloplant» [Immunological characteristics of patients with various of corneal pathologies during layer-by-layer keratoplasty using biomaterial "alloplant"]. *Meditsinskaya immunologiya – Medical Immunology*, 14(6), 513-518 [in Russian].
6. Turchyn, M.V. (2015). Dinamika pokazateley kletochnogo immuniteta krovi i vodyanistoy vlagi pri eksperimentalnoy mekhanicheskoy nepronikayushchey travme rogovitsy [Dynamics of indicators of cellular immunity of blood and aqueous humor in experimental mechanical non-penetrating corneal injury]. *Oftalmologiya. Vostochnaya Yevropa. – Ophthalmology Eastern Europe*, 4(27), 35-41 [in Russian].
7. Kasymov, E.M., Zarharly, Y.A., Namazova, Y.K., & Medzhydova, S.R. (2011). Sravnitel'naya otsenka immunologicheskoy reaktivnosti pri sochetannoy travme glaza [Comparative assessment of immunological reactivity in combined eye injury]. *Oftalmologiya – Ophthalmology*, 3(7), 50-55 [in Russian].
8. Yun, C.H., Choi, H.J., & Kim, M.K. (2021). Xenotransplantation of cornea: where are we staying? *Prog. Retin. Eye Res.*, 80. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100876. Epub, 2 August 2020 г. PMID: 32755676; PMCID: PMC7396149.
9. Cohen, D., Miyagawa, Y., Mehra, R., Lee, W., Isse, K., Long, C., Ayares, D.L., Cooper, D.K., & Hara, H. (2014). Distribution of non-gal antigens in pig cornea: relevant to corneal xenotransplantation. *Cornea*, 33, 390-397.
10. Lee, H.I., Kim, M.K., & Oh, J.Y. (2007). Gal alpha(1-3) Gal corneal expression in vitro, in vivo and during xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 14, 612-618.
11. Miyagawa, S (2017). *Xenotransplantation – New Insights*. London: IntechOpen.
12. Lee, J.J., Kim, D.H., & Jang Y.E. (2014). Attitudes towards xenocorneal transplantation in subjects on the waiting list for corneal transplantation in Korea. *Xenotransplantation*, 21, 25-34.
13. Hargrave, S.L., Mayhew, E., Hegde, S., & Niederkorn, J. (2003). Are corneal cells susceptible to antibody-mediated destruction in corneal rejection of a corneal allograft? *Immunol. Transpl.*, 11, 79-89.
14. European Convention of the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (1986). Strasbourg: Council of Europe, 123, 52.
15. Kozhemyakin, Yu.M. (2002). *Naukovo-praktychni rekomendatsiyi z utrymannya laboratornykh tvaryn ta roboty z nymy – Scientific and practical recommendations for keeping laboratory animals and working with them*. Kyiv [in Ukrainian].
16. Banders, M., Cortina-Borja, M., & Newell, M.L. (2005). Age-related standards for total lymphocyte, CD4+ and CD8+ T cell counts in children born in Europe. *Pediatr. Infect. Dys.*, 24(7), 595-600.
17. Kozarychuk, N.Ya. (2016). Sovremennyye dannyye o mekhanizmax immunnoy disfunktsii pri povrezhdenii perednego otdela glaznogo yabloka (obzor literatury) [Current data on the mechanism of immune dysfunction in the case of damage to the anterior part of the eyeball (Literature review)]. *Klinichna ta eksperymentalna patolohiya – Clinical and Experimental Pathology*, XV, 2(56), 1, 210-214 [in Russian].

## STATUS OF THE CELLULAR AND HUMORAL LINKS OF THE IMMUNE SYSTEM IN RABBITS WITH A MECHANICAL NON-PENETRATING CORNEA INJURY AND ITS CORRECTION USING XENORNEAL STROMA OBTAINED BY THE DECELLULARIZATION METHOD

©S. M. Shmyr, I. M. Klishch

*I. Horbachevsky Ternopil National Medical University*

**SUMMARY.** In the works of a number of scientists, the important role of the immune system in the pathogenesis of the inflammatory process of the injured eye is indicated, in particular, it has been proven that the occurrence and dynamics of cellular immune reactions are closely related to the course of the disease.

**The aim** – to investigate the dynamics of humoral and cellular immunity indicators in the blood of rabbits under the condition of mechanical non-penetrating corneal injury and its correction using the corneal stroma obtained by the decellularization method.

**Material and Methods.** Corneal damage was reproduced on chinchilla rabbits. In both eyes, under local epibulbar anesthesia with a 0.5 % alkaine solution and retrobulbar anesthesia with a 2 % lidocaine solution, a concentric epithelial

*Огляди літератури, оригінальні дослідження, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення*

incision was made in the upper half of the cornea with a trephine, within which the epithelium was removed together with the anterior layer of the corneal stroma with a disposable ophthalmic scalpel. The transplant material is the stroma of the pig xenocornea, obtained by the decellularization method, which was carried out by treating it with a 0.5 % solution of sodium dodecyl sulfate and, subsequently, with ultrasound followed by incubation in the presence of a 0.1 % papain solution. The concentration of the factor immunoglobulins in the blood of animals was determined by the immunoenzymatic method, the content and state of cellular immunity was assessed by the content of CD4+, CD8+. Samples were analyzed on a flow cytofluorimeter.

**Results.** The results of the conducted research indicate differences in the dynamics of the level of immune protection factors in the skin of rabbits that were simulated mechanical non-permeable corneal trauma and those animals that underwent surgical correction. In particular, simulation of mechanical trauma to the cornea leads to the activation of humoral immunity factors in the early post-traumatic period with further normalization by the 28th day and a clear violation of cellular immunity in the form of an imbalance of the subpopulation composition of T-lymphocytes with a predominant increase in T-helpers and a progressive increase in the immunoregulatory index.

Carrying out surgical correction using the equivalent of the xenocorneal stroma obtained by the decellularization method in the initial stages of the pathological process causes more pronounced disorders on the part of the immune system, caused, on the one hand, by corneal trauma, and on the other hand by the presence of a foreign substrate, albeit to a lesser degree immunogenicity than when using fresh or cryopreserved cornea. However, after 14 days, the normalization of the immune response is observed, which indicates normal engraftment of the xenograft.

**Conclusion.** The infliction of mechanical trauma to the cornea is accompanied by the activation of humoral and cellular factors of the immune response, especially at the initial stage of the pathological process. Surgical correction using pig corneal stroma obtained by the decellularization method leads to even greater activation of nonspecific resistance of the organism in the first 7 days of the experiment, followed by their normalization by the 28th day.

**KEY WORDS:** corneal injury; correction; xenoimplant; immune system; cellular immunity; humoral immunity.

Отримано 11.05.2023

Електронна адреса для листування: shmyr@tdmu.edu.ua.