



УДК 578.825.1:617.7-06

Т.З. КЕРИМОВ¹, С.А. БОРЗЕНОК^{1,2}, Н.А. ГАВРИЛОВА¹, Х.Д. ТОНАЕВА²

¹Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

²МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова МЗ РФ, 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59а

Герпесвирусная инфекция трансплантата роговицы: подходы к вирусной деконтаминации на этапе консервации

Контактная информация:

Керимов Тимур Захирович — аспирант кафедры глазных болезней, тел. (499) 488-85-02, e-mail: timkerimov2014@yandex.ru

Борзенко Сергей Анатольевич — доктор медицинских наук, академик РАЕН, профессор кафедры глазных болезней, руководитель Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем, тел. (499) 488-85-52, e-mail: cfo@mntk.ru

Гаврилова Наталья Александровна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой глазных болезней, тел. (499) 488-85-02, e-mail: kafedra_eye@mail.ru

Тонаева Хадиджат Джанхуватовна — кандидат медицинских наук, заведующая Глазным тканевым банком, тел. (499) 488-84-05, e-mail: dr.tonaeva@gmail.com

Статья содержит информацию об актуальности, эпидемиологической значимости, исторических аспектах изучения герпесвирусной инфекции, а также изложена информация, касающаяся характеристики, классификации, способах передачи и репликации герпесвирусной инфекции. Сообщаются данные о возможности реактивации, а также приводятся факторы, способствующие активации латентно протекающей герпесвирусной инфекции. Охарактеризованы основные принципы терапии на современном этапе. Представлена актуальная классификация интерферонов, описываются основные особенности синтеза интерферонов, механизм их действия, противовирусная эффективность. В хронологическом порядке приведены основные тенденции в изучении вопроса передачи герпесвирусной инфекции от донора к реципиенту при трансплантации роговицы, охарактеризовано состояние этого вопроса на данный момент, и описан инновационный способ вирусной деконтаминации донорских роговиц в условиях глазных банков, разработанный авторами.

Ключевые слова: вирус простого герпеса 1 типа, герпетический кератит, трансплантация роговицы, консервация роговицы, вирусная деконтаминация.

T.Z. KERIMOV¹, S.A. BORZENOK^{1,2}, N.A. GAVRILOVA¹, Kh.D. TONAEVA²

¹A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20/1 Delegatskaya Str., Moscow, Russian Federation, 127473

²S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, 59a Beskudnikovsky Blvd., Moscow, Russian Federation, 127486

Herpesvirus infection in cornea graft: current approaches to therapy and viral decontamination during storage

Contact information:

Kerimov T.Z. — postgraduate student of the Ophthalmology Department, tel. (499) 488-85-02, e-mail: timkerimov2014@yandex.ru

Borzenok S.A. — D. Med. Sc., Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, Professor of the Department of Eye Diseases, Head of the Center for Fundamental and Applied Biomedical Issues, tel. (499) 488-85-52, e-mail: cfo@mntk.ru

Gavrilova N.A. — D. Med. Sc., Professor, Head of the Department of Eye Diseases, tel. (499) 488-85-02, e-mail: kafedra_eye@mail.ru

Tonaeva Kh.D. — Cand. Med. Sc., Head of Eye Tissue Bank, tel. (499) 488-84-05, e-mail: dr.tonaeva@gmail.com



The article presents data on topicality, epidemiological significance, and historical aspects of herpes viral infections, as well as its characteristics, classification, means of transmission and replication. The data on reactivation are given, together with the factors promoting the activation of the latent herpes viral infection. The main modern therapy principles are described. The modern classification of interferons is given, the features of their synthesis, mechanism of action and anti-viral efficiency are described. The choronological review is presented of the main trends in studying the issue of the herpes virus transmission during cornea transplantation. The authors' innovative technique of viral decontamination of donor corneas in eye banks is described.

Key words: *herpes simplex virus type 1, herpes keratitis, cornea transplantation, cornea storage, viral decontamination.*

Одной из ведущих причин роговичной слепоты являются осложнения, вызванные инфицированием глаза вирусом простого герпеса — 1 типа [1, 2]. Герпесвирусы — это семейство ДНК-вирусов, среди которых на данный момент принято выделять 8 типов, характерных для человека. Международная классификация разделяет герпесвирусы человека на 3 подсемейства — альфа-герпесвирусы, бета-герпесвирусы, гамма-герпесвирусы. К подсемейству альфа-герпесвирусов относят: вирус простого герпеса — 1 типа, вирус простого герпеса — 2 типа, вирус ветряной оспы; к подсемейству бета-герпесвирусов — цитомегаловирус человека, вирусы герпеса человека 6 типа (а и б), вирус герпеса человека 7 типа; к подсемейству гамма-герпесвирусов — вирус Эпштейна — Барр, а также ассоциированный с саркомой Капошигерпесвирус человека 8 типа. При этом многообразии видов герпесвирусов человека именно вирус простого герпеса — 1 типа (ВПГ-1) имеет особое значение в офтальмологии, поскольку наиболее часто обнаруживается в клетках и тканях роговицы [3].

Эпидемиологические данные, сообщаемые ВОЗ (2012), свидетельствуют о том, что 67% населения планеты в возрасте до 50 лет (3,7 млрд человек) инфицированы вирусом простого герпеса — 1 типа. По данным отечественной литературы, до 90% населения России являются носителями ВПГ-1 [4].

Вирус простого герпеса был обнаружен немецким офтальмологом Grüter W. в 1912 г. ВПГ-1 представляет собой двунитевую линейную ДНК, содержащуюся в ядре, которое окружено капсидом и суперкапсидом [5]. Капсиды имеют икосаэдрическую форму диаметром 125 нм [6].

Заражение ВПГ происходит контактно-бытовым, воздушно-капельным, половым и трансплацентарным путями, при этом основной путь передачи — контактный, т.е. прямой контакт с человеком-носителем вируса в активной (репликативной) фазе. Транскрипция, репликация генома, появление новых капсидов происходит в ядре клетки хозяина. Входными воротами для инфекции служат слизистые оболочки глаза, рта, половых органов, а также кожный покров. После произошедшей вирусной инвазии кожи и слизистых характерно появление таких явлений как герпетический кератит, гингивостоматит, генитальный герпес, герпетический панариций. Также возможно развитие неонатальной герпетической вирусной инфекции и герпетического энцефалита [7].

Отличительной особенностью герпесвирусов является их способность длительно и латентно персистировать в организме хозяина. При этом вирусный геном может располагаться как внехромосомно так и быть интегрированным в ДНК клеток хозяина [8]. Латентно протекающий герпес может реактивироваться и переходить в репликативную фазу в любой момент времени [9].

По данным А.А. Каспарова: «Роговица является излюбленным местом локализации ВПГ» [5]. Автор считает, что этому способствуют три обстоятельства: 1) большое число нервных окончаний в роговице, осуществляющих защитную и трофическую функции; 2) наличие достаточно мощных постоянно замещающихся пластов эпителиальных клеток и кератоцитов, потенциально способных к замещению новыми клетками; 3) низкий уровень местного иммунитета в этой бессосудистой ткани ввиду присутствия ей оптической функции. В латентной форме ВПГ может пожизненно персистировать в нервных ганглиях, в том числе в тройничном узле.

В настоящее время основным методом лечения герпетических кератитов является консервативная терапия, а в случае ее неэффективности, а также в случае образования бельма или стойкого помутнения роговицы, возможно проведение хирургического лечения данной патологии. На сегодняшний день во всем мире с целью ликвидации последствий роговичной патологии применяют различные варианты кератопластики [10], а трансплантация роговицы является самым распространенным видом трансплантации органов человека [11].

В 1994 г. в литературе появилось сообщение G. Cleator с соавторами [12] о возможности развития реакции отторжения трансплантата в связи с передачей вируса простого герпеса через донорский материал. Авторы верифицировали наличие ВПГ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), за изобретение которой годом ранее (в 1993 г.) K. Mullis получил Нобелевскую премию. Развитие этой технологии и изучение данного вопроса позволило в 2001 году группе ученых во главе с L. Remeijer впервые в истории документально подтвердить факт передачи ВПГ-1 от донора к реципиенту с послеоперационной реактивацией этого вируса, результаты данного исследования были опубликованы в издании Lancet [13].

Определялись возможные первоисточники герпесвирусной инфекции, приводящей к дальнейшим осложнениям в паре донор-реципиент. V. Borderie и соавторы [14] в результате проведенного анализа осложнений, возникших на фоне герпесвирусной контаминации как донорского материала, так и сыворотки крови реципиентов, пришли к выводу о возможности передачи ВПГ от донора к реципиенту. При этом исследователи акцентируют внимание на том, что реципиент тоже способен являться источником вируса. Группа ученых во главе с A. Faroog по результатам проведенного анализа данных литературы также пришла к выводу о существовании двух возможных направлений передачи герпесвирусной инфекции — от донора к реципиенту и от реципиента к трансплантируемой донорской ткани роговицы [15].

Подтвержденная и многократно описанная в литературе особенность герпесвирусной инфек-



ции латентно персистировать как в роговичном трансплантате, так и в тканях реципиента вызывает обеспокоенность, поскольку представляет потенциальную угрозу развития осложнений после трансплантации по причине реактивации данного вируса, как в тканях донора, так и в тканях реципиента.

Традиционным элементом фармакологической защиты трансплантата роговицы является использование топических стероидов с целью иммуносупрессии реакции отторжения трансплантата после сквозной кератопластики. При этом данные препараты способны вызывать различные побочные эффекты, в том числе развитие вирусных инфекций [16].

P. Robert и соавторы [17] в результате длительного наблюдения за 38 реципиентами после трансплантации роговицы в послеоперационном периоде предположили, что реактивация ВПГ-1 может происходить из-за воздействия топических стероидов, особенно в сочетании с наносимой операционной травмой. A. Coonduo и соавторы [18] подробно описывают осложнения, вызванные применением топических стероидов, которые способны усугублять течение язвы роговицы, а также приводить к развитию глаукомы и катаракты.

Местное применение противовирусных препаратов является неотъемлемой частью терапии герпетических кератитов. Данная группа препаратов применяется также в случае развития герпетических кератитов в послеоперационном периоде у пациентов с трансплантированными роговицами [19]. Наиболее широко распространенным противовирусным препаратом является ацикловир. Повсеместное использование ацикловира в терапии герпетических поражений глаз привело к возникновению устойчивых к воздействию противовирусных препаратов штаммов вируса простого герпеса. Такие ацикловир-устойчивые штаммы вируса простого герпеса способны вызывать тяжело протекающие кератиты [20] и некротизирующие кератиты [21]. Выделяют три механизма, приводящие к развитию резистентности: потеря активности тимидинкиназы, перестройка тимидинкиназной активности или субстратной специфичности, изменение активности ДНК-полимеразы [22].

Описанный способ лечения герпетической инфекции аномальным нуклеозидом ацикловиром воздействует на репродукцию вируса путем интеграции в синтез вирусной ДНК, приводя к образованию дефектного генома и, следовательно, неинфекционного вируса. Существует также группа препаратов, которая перестраивает метаболизм клеток таким образом, что репродукция вируса становится невозможной, а соседние клетки приобретают невосприимчивость к инфекционному агенту. К этой группе препаратов относят интерферон и индукторы интерферонов [23].

При этом отмечено, что терапия древовидных герпетических кератитов как при помощи ацикловира, так и при помощи препаратов-индукторов интерферонов является одинаково эффективной [24]. Этому способствует ряд особенностей данной группы препаратов. Интерфероны — это группа белков с противовирусными свойствами, которые продуцируются клетками организма или высвобождаются из них в ответ на индукцию вирусами, эндотоксинами бактерий, а также другими невирусными и синтетическими веществами [5]. Интерферон впервые был описан A. Issacs и J. Lindenmann в 1957 году [25].

На данный момент выделяют три типа интерферонов, разделенных в зависимости от вида рецептора, через который передается сигнал: Интерферон (ИФН) 1 типа включает: ИФН- α (12–14 подтипов), ИФН- β , ИФН- ω , ИФН- κ , ИФН- ϵ ; Интерферон 2 типа представлен ИФН- γ ; Интерферон 3 типа включает: ИФН- λ 1, ИФН- λ 2, ИФН- λ 3. Рецепторы к интерферонам 1 типа представлены во всех тканях организма, однако величина синтеза варьирует в зависимости от типа клеток. Интерферон 2 типа продуцируется антиген-активированными Т-клетками и НК-клетками, макрофаги выделяют этот цитокин в определенных ситуациях. Интерфероны 3 типа экспрессируются только в отдельных эпителиальных клетках, связываются с отдельным рецептором, образованным лигандсвязывающей субъединицей и сигнальной трансдуцирующей субъединицей [26]. Интерферон вырабатывается любыми клетками организма, обладает видотканевой специфичностью при этом не обладает вирус-специфичностью (т.е. эффективен в отношении большинства вирусов как РНК, так и ДНК-геномных), а также подавляет внутриклеточный вирус. Интерферон подавляет репликацию вируса, воздействуя на клетки, а не на сам вирус. Таким образом, согласно Ф.И. Ершову, интерферон является важнейшим фактором неспецифической противовирусной резистентности организма [27].

Учитывая вирусологические особенности и эпидемиологическую опасность персистенции вируса простого герпеса в роговице человека и роговице доноров трупов, был разработан способ предоперационной вирусной деконтаминации донорских роговиц на этапе консервации [28]. Для реализации этого было создано средство для консервации донорских роговиц, содержащее в своем составе индуктор интерферогенеза — Полудан. Полученное средство для консервации создает условия для вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц человека на этапе органотипической консервации при 37°C, способствующие эффективной профилактики передачи герпесвирусной инфекции реципиентам после кератопластики. Это подтверждают результаты исследования, в котором использовали жизнеспособные трупные роговицы человека, полученные из Глазного тканевого банка ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в количестве 16 роговиц от 8 доноров, с наличием вируса простого герпеса — 1 типа, верифицированного методом ПЦР. Одна роговица от каждого донора являлась опытной, другая, парная, служила контрольным образцом. Роговицы из опытной группы подвергались краткосрочной органотипической консервации при 33–38°C в течение 24 часов в заявленном средстве с Полуданом (препарат разрешен к применению в офтальмологии) для индукции кератоцитам β -интерферогенеза. Через 24 часа роговицы подвергались гипотермической консервации в базисной среде для консервации роговицы (пропись Борзенка — Мороз), при 4°C в течение 2-х ($n=4$) и 6-ти ($n=4$) суток, затем выводились из эксперимента для проведения гистохимического анализа жизнеспособности эндотелия и анализа на наличие вирусов методом клеточного цитопатического эффекта (золотой стандарт). Контрольная группа роговиц подвергалась идентичному алгоритму исследования, за исключением состава среды, в которой вместо добавленного в опытной группе препарата Полудан, были использованы регуляторные пепти-

ды, которые, по данным литературы, потенциально способны стимулировать интерфероногенез. Из всех консервационных сред 16-ти образцов роговиц до начала опыта и через 24 часа после нормотермической консервации отбиралась аликвота для проведения анализа на количественное содержание β -интерферона. Эндотелий всех опытных и контрольных роговиц, по данным иммуноцитохимического анализа, оставался жизнеспособным в течение всех сроков наблюдения. Его потеря через 24 часа нормотермической консервации и через 2 и 6 сут. гипотермической консервации была незначительной и не превышала 1,5%. Во всех опытных образцах после нормотермической консервации при сокультивировании роговиц на конfluэнтном слое эпителиальных клеток не было получено цитопатического эффекта, что подтверждало полную вирусную деконтаминацию. В контрольных роговицах от тех же доноров при сокультивировании в 6 случаях из 8-ми был получен выраженный клеточный цитопатический эффект. Во всех опытных аликвотах сред после гипотермической консервации определялось наличие β -интерферона в 8-кратной концентрации по сравнению с аликвотами от контрольных роговиц.

Таким образом, впервые в мире разработан и подтвержден пилотными исследованиями оригинальный способ вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц человека на этапе консервации, обеспечивающий эффективную профилактику передачи герпесвирусной инфекции реципиентам после кератопластики.

ЛИТЕРАТУРА:

- Al-Dujaili L.J., Clerkin P.P., Clement C. et al. Ocular herpes simplex virus: how are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated? // *Future Microbiol.* — 2011. — №6. — P. 877-907.
- Royer D., Cohen A., Carr D. The Current State of Vaccine Development for Ocular HSV-1 Infection // *Expert review of ophthalmology.* — 2015. — №10. — P. 113-126.
- Kaneko H., Higaki S., Fukuda M. et al. The quantitative detection of herpes simplex virus, varicella zoster virus, and cytomegalovirus DNAs in recipient corneal buttons // *Cornea.* — 2010. — №29. — P. 1436-1439.
- Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей. — 2-е изд. — СпецЛит, 2013. — 670 с.
- Каспаров А.А. Офтальмогерпес. — М.: Медицина, 1994. — 224 с.
- Brown J.C., Newcomb W.W. Herpesvirus Capsid Assembly: Insights from Structural Analysis // *Current opinion in virology.* — 2011. — №1. — P.142-149.
- James S., Whitley R. Treatment of Herpes Simplex Virus Infections in Pediatric Patients: Current Status and Future Needs // *Clinical pharmacology and therapeutics.* — 2010. — №88. — P. 720-724.
- Baron S. *Medical Microbiology: 4th edition.* // Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. — 1996; Chapter 68.
- Azher T.N., Yin X.T., Tajfirouz D. et al. Herpes simplex keratitis: challenges in diagnosis and clinical management // *Clinical Ophthalmology.* — 2017. — №11. — P. 185-191.
- Akanda Z.Z., Naeem A., Russell E., Belrose J. et al. Graft Rejection Rate and Graft Failure Rate of Penetrating Keratoplasty (PKP) vs Lamellar Procedures: A Systematic Review // *PLOS ONE.* — 2015. — №10. — P. e0119934.
- Lawlor M., Kerridge I. Anything but the eyes: culture, identity, and the selective refusal of corneal donation // *Transplantation.* — 2011. — №92. — P. 1188-1190.
- Cleator G.M., Klapper P.E., Dennett C. et al. Corneal donor infection by herpes simplex virus: herpes simplex virus DNA in donor corneas // *Cornea.* — 1994. — №13. — P. 294-304.
- Remeijer L., Maertzdorf J., Doornenbal P. et al. Herpes simplex virus 1 transmission through corneal transplantation // *Lancet.* — 2001. — №357 (9254). — P. 442.
- Borderie V.M., Méritet J.F., Chaumeil C. et al. Culture-proven herpetic keratitis after penetrating keratoplasty in patients with no previous history of herpes disease // *Cornea.* — 2004. — №23. — P. 118-124.
- Farooq A.V., Shukla D. Corneal latency and transmission of herpes simplex virus-1 // *Future Virol.* — 2011. — №6. — P. 101-108.
- Halford W.P., Gebhardt B.M., Carr D.J. Mechanisms of herpes simplex virus type 1 reactivation // *Journal of Virology.* — 1996. — №70. — P. 5051-5060.
- Robert P.Y., Adenis J.P., Denis F. et al. Herpes simplex virus DNA in corneal transplants: prospective study of 38 recipients // *J. Med. Virol.* — 2003. — №71. — P. 69-74.
- Coondoo A., Phiske M., Verma S. et al. Side-effects of topical steroids: A long overdue revisit // *Indian Dermatology Online Journal.* — 2014. — №5. — P. 416-425.
- Goodfellow J.F.B., Nabili S., Jones M.N.A. et al. Antiviral treatment following penetrating keratoplasty for herpetic keratitis // *Eye.* — 2011. — №25. — P. 470-474.
- Choong K., Walker N.J., Apel A.J. et al. Aciclovir-resistant herpes keratitis // *Clin. Exp. Ophthalmol.* — 2010. — №38. — P. 309-13.
- Toriyama K., Inoue T., Suzuki T. et al. Necrotizing Keratitis Caused by Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus // *Case Reports in Ophthalmology.* — 2014. — №5. — P. 325-328.
- Zhang W., Suzuki T., Shiraishi A. et al. Dendritic keratitis caused by an acyclovir-resistant herpes simplex virus with frameshift mutation // *Cornea.* — 2007. — №26. — P. 105-106.
- Коваленко А.Л., Голубев С.Ю. и др. Иммунный ответ при вирусных инфекциях: Руководство для врачей / Под ред. Ершов Ф.И., Романцова М.Г. — СПб: Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, 1998. — 67 с.
- Ершов Ф.И., Коваленко А.Л., Голубев С.Ю. и др. Герпетическая инфекция: вопросы патогенеза, методические подходы к терапии / Под ред. Романцова М.Г., Голубева С.Ю. — М.: Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, 1997. — 97 с.
- Haller O. A tribute to Jean Lindenmann, co-discoverer of interferon (1924-2015) // *Cytokine.* — 2015. — №76. — P. 113-115.
- Nallar S.C., Kalvakolanu D.V. Interferons, Signal Transduction Pathways, and the Central Nervous System // *J. of Interferon & Cytokine Research.* — 2014. — №34. — P. 559-576.
- Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и патологии. — М.: Медицина, 1996. — 239 с.
- Борзенко С.А., Керимов Т.З. Антивирусная деконтаминация трансплантатов донорских роговиц на этапе консервации // *Вестник трансплантологии и искусственных органов: материалы III Российского национального конгресса «Трансплантация и донорство органов».* — 2017. — Т. XIX. — С. 221.